

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im  
Dr. von Haunerschen Kinderspital der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. D. Reinhardt

**Die Rolle von**  
**Single Nucleotide Polymorphismen im CD14-TLR2-System**  
**in der Entstehung atopischer Erkrankungen**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von  
Veronika Schickinger  
aus  
Altötting

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Kabesch

Mitberichterstatter: PD Dr. med. F. Ruëff

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 07.05.2009

Meinen Eltern in Dankbarkeit

## Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Relevanz atopischer Erkrankungen im Kindesalter	1
1.2	Bedeutung von Umweltfaktoren in der Entstehung von Atopie	2
1.3	Bedeutung der Genetik in der Entstehung von Atopie	4
1.4	Interaktion von Umwelt und Genetik in der Entstehung von Atopie	5
1.5	Die Rolle des menschlichen Immunsystems in der Atopieentstehung	8
1.5.1	Das angeborene Immunsystem	9
1.5.2	Zusammenspiel des angeborenen und des erworbenen Immunsystems bei atopischen Erkrankungen	10
1.6	Das CD14-TLR2-System	13
1.6.1	Das CD14-Rezeptorprotein	14
1.6.2	Toll-like-Rezeptoren (TLR)	15
1.6.3	Zusammenspiel von CD14 und TLR2 bei der Erkennung von LPS	15
1.6.4	Einfluss von LPS auf die Genexpression im CD14-TLR2-System	16
1.6.5	Die Genetik des CD14-TLR2-Systems in der Entstehung von Atopie	17
1.7	Die Studien ISAAC, ALEX und PARSIFAL	18
1.8	Zusammenfassung	20
1.9	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	21
2.	Material und Methoden	22
2.1	Geräte	22
2.2	Computerprogramme	23
2.3	Puffer, Lösungen und Reagenzien	24
2.3.1	Puffer, Lösungen und Reagenzien für die DNA Extraktion	24
2.3.2	Puffer, Lösungen und Reagenzien für die PCR und RFLP-Analyse	25
2.3.3	Puffer, Lösungen und Reagenzien für die Gel-Elektrophorese	25
2.3.4	Puffer, Lösungen und Reagenzien für die MALDI-TOF Massenspektrometrie	26
2.4	Reaktionskits	26
2.5	Enzyme	27
2.6	Primer	27

2.7	Sonstige Materialien	27
2.8	Probanden	28
2.8.1	Kinder aus der ISAAC Studie	28
2.8.2	Definition der Phänotypen in der ISAAC Studie	29
2.8.3	Erwachsene aus Gießen	29
2.8.4	Kinder aus der PARSIFAL Studie	29
2.8.5	Definition der Phänotypen in der PARSIFAL Studie	30
2.9	Experimentelle Methoden	31
2.9.1	DNA Extraktion	32
2.9.2	Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration	32
2.9.3	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	33
2.9.3.1	Theoretische Grundlagen	33
2.9.3.2	Experimentelle Durchführung	33
2.9.4	Gel-Elektrophorese von Nukleinsäuren im Agarose-Gel	35
2.9.5	Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus-Analyse (RFLP)	36
2.9.6	Genotypisierung mit der MALDI-TOF Massenspektrometrie	37
2.9.6.1	Theoretische Grundlagen	37
2.9.6.2	Primer Extension Preamplification (PEP)	38
2.9.6.3	Vorbereitung der Platten für die MALDI-TOF	39
2.9.6.4	PCR im Rahmen der hME-Methode für die MALDI-TOF	39
2.9.6.5	SAP-Reaktion	41
2.9.6.6	Primer-Extensions-Reaktion	42
2.9.6.7	Aufreinigung der Extensionsprodukte	44
2.9.6.8	MALDI-TOF Massenspektrometrie im Rahmen der hME-Methode	44
2.9.7	Messung von sCD14	44
2.9.8	Messung von Gesamt-IgE	45
2.10	Statistik	46
2.10.1	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht	46
2.10.2	Statistische Analysen für die Population der ISAAC Studie	46
2.10.3	Statistische Analysen für die Population der PARSIFAL Studie	47

3.	Ergebnisse	48
3.1	Charakteristika der Kinder aus der ISAAC Studie	49
3.2	Genotypisierung für den C-159T Polymorphismus im CD14-Gen bei den Kindern aus der ISAAC Studie und Erwachsenen aus Gießen	51
3.3	Assoziation des CD14 C-159T Polymorphismus mit sCD14, IgE und atopischen Phänotypen	52
3.4	Charakteristika der Kinder aus der PARSIFAL Studie	57
3.5	Genotypisierung für Polymorphismen im TLR2-Gen bei Kindern aus der PARSIFAL Studie	59
3.6	Assoziation des TLR2-540 Polymorphismus mit atopischen Phänotypen	62
3.7	Assoziation der TLR2-1868 und TLR2-29886 Polymorphismen mit atopischen Erkrankungen	65
4.	Diskussion	66
5.	Zusammenfassung	79
6.	Literaturverzeichnis	81
7.	Tabellenverzeichnis	94
8.	Abbildungsverzeichnis	95
9.	Abkürzungsverzeichnis	96
10.	Danksagung	99
11.	Lebenslauf	100

## 1. Einleitung

### 1.1 Relevanz atopischer Erkrankungen im Kindesalter

Der Begriff „Atopie“ wurde erstmals in den zwanziger Jahren des 20. Jahrhunderts von Coca und Cooke, zwei amerikanischen Allergologen, eingeführt. Das Wort „Atopie“ leitet sich vom griechischen „a-topos“ ab, das wörtlich „am falschen Ort“ bedeutet.

Grundsätzlich ist Atopie als Überempfindlichkeit von Haut und Schleimhäuten gegen verschiedene Umweltstoffe zu verstehen. Diese Überempfindlichkeit basiert auf einer Regulationsstörung immunologischer Mechanismen und resultiert in chronischen Entzündungsprozessen.

Unter atopischer Neigung fasst man drei unterschiedliche Erkrankungen zusammen: das allergische Asthma bronchiale, die allergische Rhinokonjunktivitis (Heuschnupfen) und das atopische Ekzem.

Unter einer Allergie versteht man eine von der Norm abweichende, krankhafte Reaktion des Immunsystems auf ein sonst harmloses Antigen (Janeway 2005). Der Begriff der Allergie wird für eine erworbene, histaminvermittelte Überempfindlichkeit gegenüber bestimmten Umweltstoffen, die als Allergene bezeichnet werden, verwendet.

Erkrankungen des allergischen und atopischen Formenkreises gehören zu den häufigsten chronischen Erkrankungen im Kindesalter. Besonders in den westlichen Industrienationen ist die Prävalenz dieser Erkrankungen in den letzten Jahrzehnten stark angestiegen (Keller and Lowenstein 2002).

In Schweden beispielsweise hat sich die Zahl der Kinder, die an allergischer Rhinitis, Asthma oder atopischem Ekzem leiden, in den Jahren 1979 bis 1991 in etwa verdoppelt (Kay 2001). In Deutschland sind etwa 10 % der Kinder an Asthma erkrankt (Kabesch und von Mutius 2002).

Es ist bekannt, dass Asthma und Allergien vererbare Erkrankungen sind. Als Ursache der steigenden Prävalenz atopischer Erkrankungen werden zudem häufig schädliche Umwelteinflüsse angeschuldigt.

### 1.2 Bedeutung von Umweltfaktoren in der Entstehung von Atopie

Umwelteinflüsse spielen eine entscheidende Rolle in der Entstehung und Ausprägung von Asthma und atopischen Erkrankungen. Bei der Entwicklung des Immunsystems und der Disposition für Gesundheit und Krankheit kommt dem Zeitpunkt sowie dem Muster der Exposition gegenüber Stimuli aus der Umgebung eine entscheidende Rolle zu (Rook and Stanford 1998).

Betrachtet man die weltweite Prävalenz der Symptome atopischer Erkrankungen, so kann eine bis zu achtfache Variation zwischen dem Land mit der höchsten und dem mit der niedrigsten Prävalenz beobachtet werden. Die englischsprachigen westlichen Industrienationen (ISAAC Steering Committee 1998) und Lateinamerika (Mallol et al. 2000) weisen hierbei die höchsten Prävalenzraten auf. Neben diesen regionalen Unterschieden weisen zahlreiche Studien darauf hin, dass sozioökonomische Faktoren eine Rolle in der Asthma- und Allergieentstehung spielen könnten (Strachan 2000).

In vielen Untersuchungen wurde eine inverse Beziehung zwischen der Entstehung atopischer Erkrankungen und dem Ausmaß der Exposition gegenüber mikrobiellen Erregern im Kindesalter festgestellt. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung bietet die sogenannte Hygiene-Hypothese, die 1989 von David P. Strachan formuliert wurde. Die Hygiene-Hypothese basiert ursprünglich auf der Beobachtung, dass das Auftreten atopischer Erkrankungen invers mit der Anzahl der Familienmitglieder und besonders der Anzahl älterer Geschwister assoziiert ist. Diese Assoziation wurde damit erklärt, dass die frühe und häufige Exposition gegenüber mikrobiellen Keimen durch den unhygienischen Kontakt mit älteren Familienmitgliedern bzw. Geschwistern vor Allergien schützen könnte (Strachan 1989). Seit der Erstbeschreibung erfolgten zahlreiche Modifikationen der Hygiene-Hypothese basierend auf verschiedenen Forschungsergebnissen aus den Gebieten der Epidemiologie, der klinischen und immunologischen Forschung (Schaub et al. 2006). Heute versteht man unter der Hygiene-Hypothese, dass eine Ursache für die steigende Prävalenz atopischer Erkrankungen in falsch verstandener und übertriebener Hygiene liegen könnte. Ein niedrigerer Hygienestatus im Sinne einer hohen mikrobiellen Exposition verbunden mit häufigen Infektionen im frühen Kindesalter schützt demzufolge vor der Entstehung von atopischen Erkrankungen. Zahlreiche Studienergebnisse der letzten Jahre unterstützen die Hygiene-



Hypothese. Exemplarisch sollen hier die Forschungsergebnisse des Vergleichs ost- und westdeutscher Kinder nach der Wiedervereinigung Deutschlands und die Ergebnisse der Untersuchungen an Bauernfamilien genannt werden.

Nach der Wiedervereinigung Deutschlands wurden in einigen Studien ostdeutsche Kinder mit westdeutschen Populationen derselben Altersgruppe bezüglich der Prävalenz atopischer Erkrankungen verglichen. Es zeigte sich eine deutlich höhere Prävalenz von Asthma, Heuschnupfen und positiven Hautpricktests in der Population der westdeutschen Kinder (Nicolai and von Mutius 1996; von Mutius et al. 1992; von Mutius et al. 1994). Die beiden ost- und westdeutschen Populationen haben einen sehr ähnlichen genetischen Hintergrund, unterscheiden sich jedoch deutlich in den Umweltbedingungen, unter denen die Kinder aufwuchsen. Beispielsweise hatten ca. 70 % der ostdeutschen, allerdings nur etwa 8 % der westdeutschen Kinder im Alter von 1 bis 3 Jahren regelmäßig eine Kinderkrippe besucht (von Mutius et al. 1994). Der Kontakt zu anderen Kindern in einer Kinderkrippe bzw. zu älteren Geschwistern innerhalb der Familie trägt zu häufigeren Infektionen, insbesondere der Atemwege, bei (Marbury et al. 1997). Diese zumeist selbstlimitierenden Infektionen könnten vor einer späteren Entwicklung von Allergien und Asthma schützen (Ball et al. 2000). Es wurde eine inverse Korrelation zwischen der Größe der Familie bzw. der Anzahl der Geschwister in einer Familie und der Prävalenz von Asthma und Atopie beobachtet (Strachan 1989; Strachan 1997).

Es gibt Hinweise darauf, dass auch ein traditioneller Lebensstil eine Protektion vor allergischen Erkrankungen bieten könnte. Auf diesen Hinweisen basieren die sogenannten „Bauernstudien“, in denen der Zusammenhang zwischen den Lebensumständen auf einem Bauernhof und atopischen Erkrankungen untersucht wird. Kinder aus Bauernfamilien leiden im Vergleich zum übrigen Bevölkerungsdurchschnitt derselben Altersgruppe signifikant weniger häufig an Allergien und Asthma (von Ehrenstein et al. 2000; Braun-Fahrlander et al. 1999). Die Lebens- und Umweltbedingungen in Bauernfamilien unterscheiden sich in vielen Aspekten von denen anderer Familien. In Bauernfamilien leben z.B. mehr Familienmitglieder und mehr Haustiere, es wird häufiger mit Holz oder Kohle geheizt, weniger Mütter rauchen und die Ernährungsgewohnheiten sind anders. Jedoch konnte bisher keiner dieser Faktoren eine adäquate Erklärung für die stark inverse Assoziation zwischen Bauernleben und Atopie und Asthma bieten. Deshalb wird vermutet, dass Menschen, die auf einem Bauernhof aufwachsen, durch die

Exposition gegenüber bestimmten immunmodulierenden Faktoren, die spezifisch für das Bauernleben sind, vor diesen Erkrankungen geschützt werden (Kabesch und Lauener 2004). Der vermehrte Kontakt von Bauernkindern mit Nutztvieh könnte protektiv gegen Allergien wirken. Dieser Effekt könnte durch verschiedene Faktoren noch verstärkt werden, wie z.B. durch den Aufenthalt des Kindes im Stall während des ersten Lebensjahres, den Konsum von nicht pasteurisierter Milch oder die Stallarbeit der Mutter während der Schwangerschaft (Riedler et al. 2001; Radon et al. 2004; Braun-Fahrländer et al. 2002).

In bisherigen Untersuchungen haben sich Hinweise darauf ergeben, dass ein wesentlicher Faktor des Bauernlebens die Exposition gegenüber bakteriellen Mikroorganismen ist. Dabei könnte die Exposition gegenüber bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS), auch Endotoxin genannt, ein protektiver Umweltfaktor sein, der vor der Entwicklung von Asthma und Allergien schützt. In bisherigen Analysen im Rahmen von Bauernstudien waren das Risiko allergischer Sensibilisierung und das Asthmarisiko invers mit der Konzentration von Endotoxin im Hausstaub assoziiert (Braun-Fahrländer et al. 2002, Ege et al. 2007).

### 1.3 Bedeutung der Genetik in der Entstehung von Atopie

Asthma und atopische Erkrankungen weisen eine familiäre Häufung auf. Eine genetische Komponente bei der Entstehung dieser Erkrankungen konnte in zahlreichen Studien nachgewiesen werden.

Bei einem an Asthma erkrankten Elternteil entwickelt sich bei ca. 25 % der Kinder ein asthmatischer Phänotyp (Panhuysen et al. 1998). Basierend auf Zwillingsstudien wird der hereditäre Anteil an der Entstehung von Asthma auf bis zu 75 % geschätzt (Harris et al. 1997). Bei Vergleichen von monozygoten Zwillingen mit einem zu 100 % identischen Erbgut mit dizygoten Zwillingen zeigten die monozygoten Zwillinge eine deutlich höhere Konkordanz im Auftreten von allergischen Erkrankungen und Asthma (Edfors-Lubs 1971; Duffy et al. 1990; Hopp et al. 1984). Auch Segregationsanalysen, in denen Auftreten und Verteilung einer Erkrankung über mehrere Generationen in einer möglichst großen Anzahl von Familien untersucht werden, bieten Anhalt für eine genetische Komponente für Asthma und erhöhte Gesamt-IgE-Spiegel (Martinez and Holberg 1995; Sampogna et al. 2000).

Die Komplexität der atopischen Erkrankungen sowie deren vielfältige klinische Erscheinungsformen legen nahe, dass es sich bei ihrer Entstehung um einen polygenen Vererbungsmodus handelt. Das bedeutet, dass wahrscheinlich nicht ein einzelnes „Asthma-Gen“ existiert, sondern dass die genetische Prädisposition zur Entwicklung von Asthma und atopischen Erkrankungen durch die Interaktion multipler Gene bedingt sein könnte. Eine Methode zur Identifizierung von Genen, die an der Entstehung von Asthma und atopischen Erkrankungen beteiligt sind, ist die Untersuchung von Kandidatengenen. Ein Kandidatengen wird als solches bezeichnet, wenn sein Produkt (Protein) im Organismus eine Funktion ausübt, die in einem bedeutenden Zusammenhang mit der Pathogenese der Erkrankung steht. Diese Gene werden auf Mutationen untersucht, bei denen es sich meist um einen Basenaustausch an einer einzigen Position ("Single Nucleotide Polymorphism", SNP) handelt. Als Polymorphismus wird eine Mutation bezeichnet, die bei mehr als 3 % der Bevölkerung zu finden ist. Polymorphismen, die in kodierenden Regionen des Gens liegen, können Veränderungen der Aminosäurestruktur des Proteins bewirken. Auch die Expression von Genen kann durch Polymorphismen, die in Regulationselementen des Gens wie beispielsweise der Promoterregion liegen, beeinflusst werden.

### 1.4 Interaktion von Umwelt und Genetik in der Entstehung von Atopie

Die Entwicklung des Immunsystems läuft in einem genetisch determinierten Rahmen ab. Die Bandbreite der Reaktionsfähigkeit des Immunsystems ist genetisch festgelegt. Damit wird auch das individuelle Risiko für die Entwicklung einer Erkrankung des atopischen Formenkreises vererbt. Äußere Faktoren wie z.B. Infektionen oder andere Umwelteinflüsse könnten das Immunsystem innerhalb des genetisch festgesetzten Rahmens in verschiedene Richtungen lenken, die zur Ausprägung eines bestimmten Phänotyps führen. Bestimmte Umwelteinflüsse könnten bei Personen, die aufgrund ihrer genetischen Prädisposition zu atopischen Erkrankungen neigen, die Entstehung dieser Erkrankung auslösen. Bestehen jedoch andererseits besonders günstige (protektive) Umweltbedingungen, dann könnte dies dazu führen, dass auch bei einer Person mit hohem genetischem Risiko die atopische Erkrankung nicht auftritt.

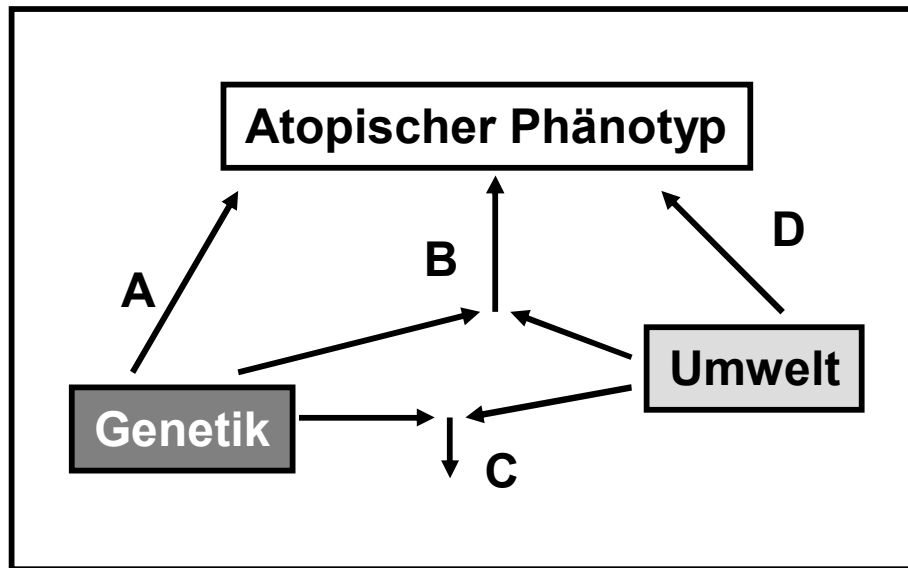
Es sind zahlreiche Faktoren bekannt, die die Erkrankung an sowie die klinische Expression von Allergien und Asthma beeinflussen können. Für verschiedene genetische Faktoren, aber auch für Umweltfaktoren konnte eine Assoziation mit der Anfälligkeit für Atopie oder mit dem Schutz vor atopischen Erkrankungen nachwiesen werden. Der Schluss liegt nahe, dass weder die genetischen Effekte noch die Umweltbedingungen für sich alleine betrachtet eine Erklärung für das Auftreten von oder den Schutz vor atopischen Erkrankungen liefern können. Vielmehr ist von einem Zusammenspiel der verschiedenen Faktoren im Sinne von Gen-Umwelt-Interaktionen auszugehen.

Unter Gen-Umwelt-Interaktion wird häufig verstanden, dass Gene die Potentiale und Grenzen des Körpers definieren, auf Umweltbedingungen zu reagieren. Bei manchen angeborenen Stoffwechselerkrankungen beispielsweise ist das Vorhandensein von bzw. der Mangel an einem bestimmten Enzym genetisch bedingt. Somit wird die Reaktion des Organismus auf bestimmte Nahrungsmittel bzw. darin enthaltene Aminosäuren durch seine genetische Prädisposition bestimmt. Diese genetische Prädisposition kann jedoch nur in einer Umwelt sichtbar werden, in der z.B. die betreffende Aminosäure vorhanden ist. Wäre z.B. die betreffende Aminosäure nicht ubiquitär, sondern nur in einer exotischen Frucht vorhanden, würden die Auswirkungen der Stoffwechselkrankheit nur sehr selten zu Tage treten oder sogar auf den ersten Blick wie eine Intoxikation imponieren (Kabesch 2006a). Bei komplexeren Erkrankungen sind die Gen-Umwelt-Interaktionen weniger klar als in dem genannten Beispiel. Hier überlappen sich multiple genetische Faktoren und Umwelteffekte, die voneinander abhängig oder unabhängig sein können. Ein Phänotyp könnte sowohl durch einen genetischen Faktor als auch durch eine Umweltbedingung hervorgerufen sein (Kabesch 2006a). Es ist bei komplexen Erkrankungen wie Asthma davon auszugehen, dass ein Zusammenspiel von genetischen Faktoren und Umweltbedingungen zur Ausprägung der Erkrankung beiträgt. Die Exposition gegenüber Umweltfaktoren wie z.B. Ozon, Zigarettenrauch, Staubpartikeln und Hausstaubmilben sowie bakteriellen und viralen Infektionen kann zur klinischen Manifestation bzw. Exazerbation von Asthma führen. Beim allergischen Asthma besteht meist eine Sensibilisierung gegenüber bestimmten Aeroallergenen. Diese Sensibilisierung, die in den ersten Lebensjahren erfolgt, könnte auf einer genetischen Prädisposition beruhen und durch Exposition gegenüber dem jeweiligen Allergen getriggert werden. Somit könnten bestimmte

Umweltfaktoren eine atopische Erkrankung bei Menschen induzieren, die durch ihren Genotyp anfällig für diese Erkrankung bzw. für einen bestimmten Stimulus sind.

In den letzten Jahrzehnten wurden hierzu zahlreiche Hypothesen aufgestellt. Es wird vermutet, dass Luftverschmutzung und speziell aktives und passives Tabakrauchen stärkere schädliche Effekte bei Menschen haben, die genetisch bedingt bestimmte Abwehrmechanismen eingeschränkt aufweisen (Kabesch 2006b). Ein Beispiel für solche Abwehrmechanismen sind die Glutathion-S-Transferasen (GST), Enzyme, die im menschlichen Organismus bei Abbauprozessen von toxischen Bestandteilen des Tabakrauchs, aber auch anderen luftverschmutzenden Substanzen maßgeblich beteiligt zu sein scheinen (Sheehan et al. 2001). Zahlreiche Studien der letzten Jahre bieten Hinweise darauf, dass ein genetisch bedingter Mangel an Glutathion-S-Transferasen oder Polymorphismen in den GST Genen im Zusammenwirken mit Tabakrauchexposition in utero und im Kindes- und Erwachsenenalter ein höheres Risiko für Asthma und fetale Mangelentwicklung der Lunge bzw. später erworbene Einschränkungen der Lungenfunktion bewirken (Ivaschenko et al. 2001; Cook and Strachan 1998; Kabesch et al. 2004). Experimentelle Untersuchungen, die vermehrte DNA-Schäden bei einem Mangel an bestimmten GST zeigen, unterstützen diese Ergebnisse (Ollikainen et al. 1998; van Poppel et al. 1992). Genetische Veränderungen der GST Enzyme scheinen auch zu negativen gesundheitlichen Effekten anderer Umweltfaktoren beizutragen, wie z.B. Diesel-Abgaspartikel (Gilliland et al. 2004) oder Ozon (David et al. 2003).

Gen-Umwelt-Interaktionen könnten nicht nur an der Expression atopischer Erkrankungen, sondern auch am Schutz vor der Entwicklung solcher Krankheiten beteiligt sein. Abbildung 1 zeigt verschiedene Möglichkeiten, wie Genetik und Umweltfaktoren sowie Gen-Umwelt-Interaktionen die Entstehung eines atopischen Phänotyps beeinflussen könnten.



**Abbildung 1. Vom Genotyp zum Phänotyp.** (adaptiert aus Kabesch 2004)

(A) Eine starke genetische Prädisposition könnte direkt zur Expression eines atopischen Phänotyps führen.

(B) Ein atopischer Phänotyp könnte aus einer Interaktion von Genetik und Umweltfaktoren entstehen.

(C) Die genetische Prädisposition und Umweltbedingungen könnten sich antagonisieren, so dass es zu keiner klinischen Expression von Atopie kommt.

(D) Auch in Abwesenheit einer genetischen Prädisposition könnte das Vorliegen starker Umweltfaktoren zur Ausprägung eines atopischen Phänotyps führen.

### 1.5 Die Rolle des menschlichen Immunsystems in der Atopieentstehung

Für die Untersuchung von Gen-Umwelt-Interaktionen in der Atopieentstehung ist es von zentraler Bedeutung, Strukturen auf molekularer Ebene zu identifizieren, an denen eine Gen-Umwelt-Interaktion möglich erscheint. Da atopische Erkrankungen auf fehlgeleiteten immunologischen Reaktionen beruhen, liegt es nahe, dass diese Strukturen innerhalb des menschlichen Immunsystems liegen. Das Immunsystem und insbesondere die Komponenten des sogenannten angeborenen Immunsystems haben sich unter der Exposition gegenüber einer durch mikrobielle Organismen dominierten Umwelt über Millionen von Jahren gebildet und genetisch weiterentwickelt. Über diese lange Zeit funktionierten die Mechanismen des Immunsystems effektiv in der Abwehr des Körpers gegen mikrobielle Keime und Fremdkörper. Ab dem Zweiten Weltkrieg trat eine rasche und dramatische Veränderung der Umweltbedingungen, denen wir ausgesetzt sind, ein. Zeitgleich mit dieser starken Veränderung der Umweltfaktoren kam es zu einer deutlichen

Zunahme der Prävalenz atopischer Erkrankungen als Ausdruck einer inadäquaten Reaktion des Immunsystems auf Umwelteinflüsse.

Es wäre möglich, dass zum einen das veränderte Pathogenumfeld und zum anderen Veränderungen in der Pathogenerkennung durch die Bestandteile des angeborenen Immunsystems über Gen-Umwelt-Interaktionen in Zusammenhang mit der gesteigerten Atopieprävalenz stehen könnten.

### 1.5.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem steht an vorderster Front bei der immunologischen Abwehr von Pathogenen. Es dient zur Sofortverteidigung des Organismus gegen eindringende Mikroorganismen innerhalb weniger Minuten bis Stunden. Der menschliche Körper ist durch den Kontakt mit seiner Umwelt ständig Mikroorganismen, potentiell infektiösen Keimen und Fremdkörpern ausgesetzt. Angesichts der ständigen Exposition gegenüber Pathogenen ist es erstaunlich, dass infektiöse Erkrankungen verhältnismäßig selten auftreten. Dafür sind die effektiven Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems maßgeblich verantwortlich.

Die erste Barriere gegen eindringende Keime stellen die epithelialen Oberflächen der Schleimhaut im Respirations- und Gastrointestinaltrakt sowie der Haut dar. Auch wenn Mikroorganismen es schaffen, diese Barriere zu durchbrechen, verfügt das angeborene Immunsystem im darunter liegenden Gewebe über effektive Mechanismen zur Vernichtung der Mikroorganismen.

Nach dem Eindringen eines Pathogens wird es in der Regel sofort von Gewebsmakrophagen oder neutrophilen Granulozyten im Blut erkannt und über Phagozytose ins Zellinnere aufgenommen (Janeway 2005). Dabei erkennen die Zellen des angeborenen Immunsystems einfache, phylogenetisch konservierte molekulare Strukturen, die man auch als pathogenassoziierte molekulare Muster ("pathogen associated molecular patterns", PAMP) bezeichnet. Ein Beispiel für ein PAMP ist bakterielles Lipopolysaccharid (LPS, Endotoxin), ein Bestandteil der meisten gramnegativen Bakterien.

Die entsprechenden Rezeptoren zur Erkennung eines PAMP werden als Mustererkennungsrezeptoren („Pattern recognition receptors“, PRR) bezeichnet. Die PRR können auf der Oberfläche von Makrophagen und antigenpräsentierenden Zellen (APC) exprimiert sein, frei im Plasma zirkulieren oder im Intrazellulärraum

lokalisiert sein. Beispielsweise wird die Erkennung von LPS über die Mustererkennungsrezeptoren CD14 und TLR2, die als Rezeptorsystem interagieren, vermittelt.

Der Mechanismus und die Schnelligkeit der Antwort des angeborenen Immunsystems sind unabhängig davon, wie oft der Antigenkontakt stattfindet, da im angeborenen Immunsystem keine Entwicklung eines immunologischen Gedächtnisses im Sinne einer klonalen Selektion spezifischer Rezeptoren erfolgt. Das angeborene Immunsystem verfügt somit über eine relativ kleine Auswahl an Mustererkennungsrezeptoren mit einer nur geringen Spezifität für Strukturen des Antigens.

Obwohl die Mustererkennungsrezeptoren entwicklungsgenetisch konservierte Strukturen und damit in ihrer Reaktionsfähigkeit im Wesentlichen festgelegt sind, kann über sie eine riesige Bandbreite von mikrobiellen Erregern schnell als körperfremd erkannt und bezüglich der Pathogenität eingeordnet werden. Bemerkenswert ist dabei, dass bereits auf dieser phylogenetisch frühen Stufe des Immunsystems zwischen pathogenen und nicht pathogenen Strukturen unterschieden werden kann. Auch beim Kontakt des Körpers mit potentiell allergieauslösenden Stoffen stehen die Mustererkennungsrezeptoren an der ersten Stelle einer Kaskade von immunologischen Reaktionen.

### 1.5.2 Zusammenspiel des angeborenen und des erworbenen Immunsystems bei atopischen Erkrankungen

Die immunologischen Mechanismen, die den ersten Schritt in Richtung der Entwicklung einer atopischen Erkrankung bedeuten könnten, scheinen im angeborenen Immunsystem zu liegen. Wesentliche pathophysiologische Vorgänge in der Expression eines atopischen Phänotyps jedoch spielen sich innerhalb des zweiten Teilbereiches des menschlichen Immunsystems, nämlich im erworbenen (adaptiven) Immunsystem ab. Die Mustererkennungsrezeptoren werden als entscheidende Verbindungsstellen zwischen dem angeborenem und adaptivem Immunsystem angesehen (Akira et al. 2001; Medzhitov and Janeway Jr. 1997).

Nach der Einteilung der Überempfindlichkeitsreaktionen, die auf die beiden britischen Immunologen Coombs und Gell zurückgeht, entspricht die allergische Reaktion im Allgemeinen einer Typ I Reaktion und damit der durch Immunglobulin E (IgE)



vermittelten Überempfindlichkeitsreaktion vom Soforttyp. IgE-Antikörper werden durch die B-Lymphozyten gebildet, die für die humorale Immunreaktion des erworbenen Immunsystems verantwortlich sind. Die Bildung der IgE-Antikörper erfolgt in einer Sensibilisierungsphase, die sehr unterschiedliche Zeitspannen umfassen kann und für den Betroffenen unbemerkt abläuft. Ist das Immunsystem auf ein Allergen sensibilisiert, wird bei erneutem Kontakt eine durch IgE vermittelte allergische Reaktion ausgelöst.

IgE ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 190 kDa. Es wird überwiegend in den Plasmazellen der Schleimhaut des Darms und des Respirationstraktes gebildet und ins Blut abgegeben. IgE hat u.a. eine natürliche Rolle in der Parasitenabwehr. Wurminfektionen des Darms beispielsweise lösen im Körper eine erhöhte Ausschüttung von IgE aus (Jarrett and Bazin 1974; Finkelman et al 1988).

Bei der Auslösung einer allergischen Reaktion binden die allergenspezifischen IgE-Antikörper mit Ihrem Fc-Teil an den hochaffinen IgE-Rezeptor FcεRI auf der Oberfläche von Mastzellen im Gewebe und auf basophilen und eosinophilen Granulozyten im Blut (Sutton and Gould 1993). Diese Zellen enthalten Granula, die mit verschiedenen Entzündungsmediatoren wie z. B. Histamin gefüllt sind. Bindet ein Antigen an zwei benachbarte gebundene IgE und kommt es dadurch zur Vernetzung der IgE-Moleküle, so degranuliert die Zelle und die Entzündungsmediatoren werden freigesetzt. Die Mediatoren bewirken beispielsweise die Kontraktion der glatten Muskulatur des Bronchialsystems, die ein Hauptsymptom von Asthma ist. Weiterhin vermitteln sie eine Permeabilitätserhöhung von Gefäßen und erhöhen die Produktion von Bronchialsekret, was in den typischen Heuschnupfensymptomen resultiert. Atopische Erkrankungen sind durch IgE vermittelte Entzündungsmechanismen gekennzeichnet. Atopiker weisen einen höheren Gesamt-IgE-Spiegel auf als Nichtatopiker. Eine Assoziation mit erhöhten IgE-Spiegeln im Serum konnte für Asthma (Burrows et al. 1989), für ein hyperreagibles Bronchialsystem (Sears et al. 1991), sowie die Hautreaktion im Pricktest nachgewiesen werden (Droste et al. 1996).

Bei der zellulären Immunabwehr des adaptiven Immunsystems, die über die T-Lymphozyten vermittelt wird, unterscheidet man T-Killerzellen und T-Helferzellen. Die T-Helferzellen (T<sub>H</sub>-Zellen) können in verschiedene Subpopulationen unterteilt werden, deren Differenzierung sich nach dem Antigenkontakt entscheidet. Die

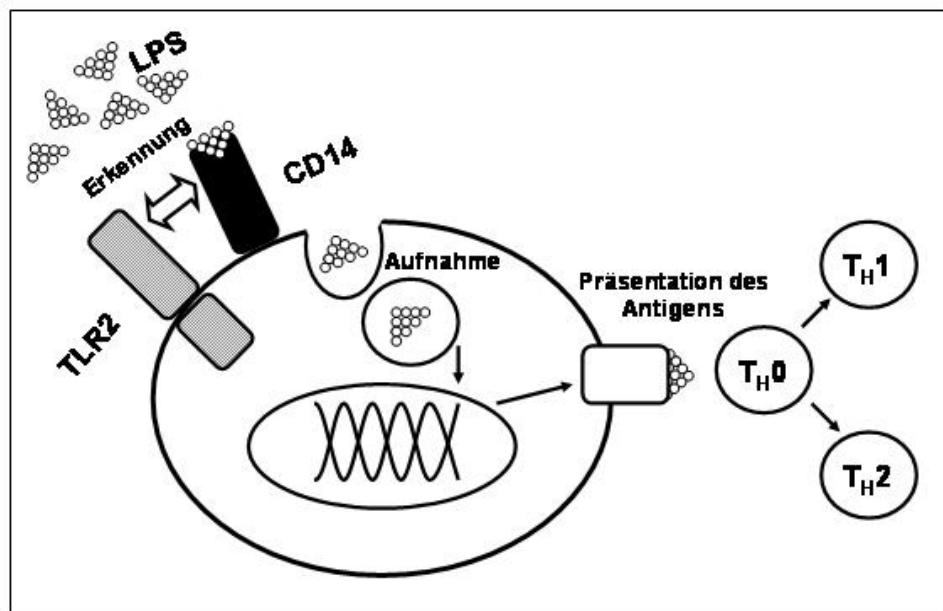
Rezeptoren auf der Zelloberfläche der T-Lymphozyten werden durch Antigenkontakt geprägt. Durch klonale Vermehrung der antigenspezifisch geprägten Lymphozyten bildet sich ein immunologisches Gedächtnis aus.

Das angeborene und das erworbene Immunsystem agieren nicht unabhängig voneinander, sondern sind auf vielfältige Art und Weise miteinander verknüpft (Fearon and Locksley 1996). Die Aktivierung des angeborenen Immunsystems ist eine Hauptvoraussetzung für die Aktivierung der erworbenen Immunantwort (Janeway Jr. 1989). Nach der Erkennung eines PAMP durch einen Mustererkennungsrezeptor auf den antigenpräsentierenden Zellen (APC) des angeborenen Immunsystems kommt es zur Phagozytose des Antigens und zur Präsentation von Antigenfragmenten auf der Zelloberfläche. Die präsentierten Antigenfragmente können so von den T-Lymphozyten durch deren spezifische Rezeptoren erkannt werden. Durch Exposition gegenüber APC und deren Stimuli kommt es über die Produktion verschiedener Zytokine zur Differenzierung der ungeprägten "naiven"  $T_H0$  Zellen in  $T_H1$ - oder  $T_H2$ -Zellen. Die beiden  $T_H$ -Subpopulationen können sich gegenseitig regulieren. Die Zytokine, die von  $T_H1$ -Zellen produziert werden, hemmen die Aktivierung von  $T_H2$ -Zellen und umgekehrt.

Im reifen menschlichen Immunsystem besteht normalerweise eine Dominanz des  $T_H1$ -Systems gegenüber den  $T_H2$ -Zellen. Hingegen zeigen Studien über die Zytokinausschüttung von mononukleären Blutzellen von Feten und Neugeborenen, dass das unreife Immunsystem durch eine  $T_H2$ -Dominanz charakterisiert ist. Der Fetus wird bereits in utero mit Antigenen oder Bestandteilen von Antigenen aus der Umgebung der Mutter konfrontiert, die die Plazenta passieren können. Die Aktivität der  $T_H1$ -Zellen wird durch Zytokine, die von Anteilen der Plazenta produziert werden, reduziert, möglicherweise zur Verhinderung der zellulär bedingten Abstoßungsreaktion während der Schwangerschaft. Nach der Geburt verändert sich das Immunsystem durch Kontakt der T-Lymphozyten mit verschiedenen Umweltfaktoren. Das kindliche Immunsystem reift durch die Stimulierung der  $T_H1$ -Zellen und der Entstehung einer natürlichen Dominanz des  $T_H1$ -Systems. Die gegenseitigen Regulationen der T-Lymphozyten führen dazu, dass bestimmte Immunreaktionen durch eine Dominanz von humoralen ( $T_H2$ -vermittelten) oder zellulären ( $T_H1$ -vermittelten) Mechanismen gekennzeichnet sind. Ein Überwiegen des  $T_H2$ -Systems scheint mitverantwortlich für die Entstehung von Allergien zu sein (Romagnani 1992). Bei allergischen Erkrankungen kommt es zur vermehrten

Ausschüttung von  $T_H2$ -typischen Zytokinen wie IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13.  $T_H2$ -spezifische Zytokine bewirken eine vermehrte Freisetzung von IgE, die ein Hauptcharakteristikum atopischer Erkrankungen ist.

Abbildung 2 illustriert stark schematisch vereinfacht das Zusammenspiel des angeborenen und des erworbenen Immunsystems von der Erkennung von LPS durch das CD14-TLR2-Rezeptorsystem bis zur Beeinflussung der T-Zell-Differenzierung.



**Abbildung 2. Zusammenspiel des angeborenen und des erworbenen Immunsystems am Beispiel der Erkennung von LPS durch das CD14-TLR2-Rezeptorsystem.**

Die Erkennung von Bakterienbestandteilen wie LPS durch das Zusammenspiel der Rezeptoren CD14 und TLR2 führt zur Aufnahme von LPS in die Zelle und über Signaltransduktionswege zur Antigenpräsentation auf den antigenpräsentierenden Zellen. Dadurch kommt es über die Induktion der Zytokinproduktion zur Differenzierung der ungetriggerten T-Helfer-Lymphozyten ( $T_H0$ ) in die  $T_H1$ - oder  $T_H2$ -Subpopulationen.

### 1.6 Das CD14-TLR2-System

Der CD14-Rezeptor und die sogenannten Toll-like-Rezeptoren sind Mustererkennungsrezeptoren auf den Zellen des angeborenen Immunsystems. Ihr Zusammenspiel bei der Erkennung von Endotoxin macht sie zu wichtigen Zielstrukturen bei der Erforschung der Asthma- und Allergieentstehung.

### 1.6.1 Das CD14-Rezeptorprotein

Der CD14-Rezeptor ist ein Glykoprotein mit einer molekularen Masse von ca. 55 kDA, das sich auf der Oberfläche von Monozyten, Makrophagen und Leukozyten befindet (Wright 1995). Die kodierende Genregion für CD14 liegt auf Chromosom 5q 23-31 (Goyert et al. 1998). Das Gen überspannt ca. 3900 Basenpaare (Schumann et al. 1994). Zuerst wurde die Funktion von CD14 als Rezeptor für Lipopolysaccharid (LPS) entdeckt (Wright et al. 1990). LPS, das auch als Endotoxin bezeichnet wird, ist ein Bestandteil der meisten gramnegativen Bakterien. Mittlerweile gibt es Hinweise darauf, dass auch Reaktionen gegen Pathogene grampositiver Bakterien, von Mykobakterien und möglicherweise auch Viren über den CD14-Rezeptor vermittelt werden (Dobrovolskaia and Vogel 2002).

CD14 existiert neben der membrangebunden Form (mCD14) auch in einer löslichen Form als „soluble“ CD14 (sCD14) im Serum. Normalerweise enthält das menschliche Serum sCD14 in Konzentrationen von zwei bis drei Mikrogramm pro Milliliter (Durieux et al. 1994). sCD14 wird über zwei unterschiedliche Mechanismen freigesetzt und existiert in zwei löslichen Isoformen (Bazil et al. 1989). Einerseits entsteht es durch proteolytisches Ablösen von membrangebundenem CD14 von der Zellmembran, was als "Shedding" bezeichnet wird. Andererseits kann sCD14 auch direkt von den Zellen sezerniert werden (Bufler et al. 1995). Zellen, die kein mCD14 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren und keine Reaktion auf Stimulation mit LPS zeigen, können nach Zugabe von sCD14 durch LPS aktiviert werden. Demnach könnte sCD14 eine wesentliche Rolle bei der Zellantwort auf LPS zukommen (Frey et al. 1992). Zusammen mit dem Lipopolysaccharidbindenden Protein (LBP) bildet LPS Lipopolysaccharidkomplexe (Wright 1990). Eine weitere Hypothese zur Funktion von sCD14 lautet, dass es Komplexe aus LPS und LBP binden und neutralisieren kann, so dass die Reaktion der Zellen auf Endotoxin gehemmt wird (Maliszewski 1991). In anderen Studien wird sCD14 genau die gegenteilige Funktion, nämlich die Stimulierung der LPS-Reaktion, zugeschrieben (Frey et al. 1992).

### 1.6.2 Toll-like-Rezeptoren (TLR)

Zu den Mustererkennungsrezeptoren des angeborenen Immunsystems zählen neben CD14 auch die Toll-like-Rezeptoren (TLR). Diese Art von Rezeptoren wurde zuerst bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* beschrieben und „Toll“ genannt. Die zytoplasmatische Domäne des Toll-Proteins weist große Ähnlichkeit zur der des Interleukin-1-Rezeptors (IL-1R) bei Säugetieren auf (Gay and Keith 1991). Die strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit dieser Rezeptoren deutet darauf hin, dass diese Mechanismen evolutionär konserviert und essentiell für die Abwehr gegen mikrobielle Erreger sind. Die zum Toll-Rezeptor der Fruchtfliege homologe Rezeptorfamilie beim Menschen wird als Toll-like-Rezeptoren (TLR) bezeichnet. Bisher sind beim Menschen zehn verschiedene TLR beschrieben worden.

Die Signalkaskade der Toll-like-Rezeptoren führt zur Aktivierung von Genen, deren Produkte eine Rolle für das Immunsystem und die Entzündungsreaktion spielen (Medzhitov and Janeway Jr. 1997).

### 1.6.3 Zusammenspiel von CD14 und TLR2 bei der Erkennung von LPS

Das membrangebundene CD14-Rezeptorprotein weist weder transmembranöse noch intrazelluläre Domänen auf. Somit kann der CD14-Rezeptor alleine keine Signalübertragung ins Zellinnere auslösen. Einige der Toll-like-Rezeptoren erfüllen hierbei die Funktion als Corezeptoren von CD14 bei der transmembranösen Signalübertragung (Medzhitov et al. 1997). Nach der Bindung von LPS kommt es zur Zusammenlagerung von CD14 mit TLR2 oder TLR4, was zu einer Aktivierung der TLR-Signalkaskade führt (Kaisho and Takira 2001). Es gibt Hinweise darauf, dass insbesondere der Toll-like-Rezeptor 2 (TLR2) mit CD14 bei der Erkennung von LPS durch die Bildung eines Rezeptorkomplexes interagiert (Yang et al. 1999). Überexpression von TLR2 führt dazu, dass menschliche embryonale Nierenzellen der Zelllinie 293 auf LPS reagieren (Yang et al. 1998 ; Kirschning et al. 1998). Andererseits weisen auch Zellen mit einem defekten TLR2-Gen eine normale Antwort auf LPS auf (Takeuchi et al. 1999; Heine et al. 1999). Es hat sich gezeigt, dass atypische Lipopolysaccharide der Bakterien *Leptospira interrogans* und *Porphyromonas gingivalis* Zellen über TLR2 aktivieren können (Werts et al. 2001;

Hirschfeld et al. 2001). Neben LPS sind noch weitere Liganden des TLR2 bekannt, die in Tabelle 1 aufgeführt sind.

<b>Toll-like-Rezeptor</b>	<b>Liganden</b>	<b>Herkunft der Liganden</b>
TLR2	Lipoproteine	Bakterien
	Lipopolysaccharid, Glykolipide	Spirochäten
	Peptidoglykan, Lipoteichoic Acid	Grampositive Bakterien
	Lipoarabinomannan	Mykobakterien
	Lipopolysaccharid, Fimbrien	Porphyromonas gingivalis
	Zymosan	Hefe
	GPI Anker	Trypanosoma cruzi
	Membranprotein A	Klebsiellen
	Porin	Neisserien

**Tabelle 1. Liganden des Toll-like-Rezeptors 2 (TLR2).** (adaptiert aus: Akira and Hemmi 2003)

### 1.6.4 Einfluss von LPS auf die Genexpression im CD14-TLR2-System

In In-vitro-Untersuchungen an Zellen konnte gezeigt werden, dass die Genexpression von CD14 und TLR2 in vitro durch Stimulation mit LPS gesteigert werden kann.

Die Veränderung der CD14-Expression nach LPS Stimulation war in den In-vitro-Studien abhängig sowohl von der Dosis als auch von der Einwirkzeit (Landmann et al. 1996; Marchant et al. 1992). Andere Studien zeigen, dass hohe LPS Dosen (100 ng/ml) bei einer Einwirkzeit von 3 bis 18 Stunden die mCD14-Expression herunterregulieren (Bazil and Strominger 1991; Wright 1995). Bei Patienten, die an einem septischen Schock litten, wurde in einer Ex-vivo-Untersuchung eine reduzierte CD14-Expression auf Monozyten beobachtet (Ertel et al. 1995). Somit scheint ein Rückkopplungsmechanismus zwischen der Endotoxinkonzentration in der Umgebung und der Expression des CD14-Rezeptors zu bestehen. Auf Proteinebene bietet sich zur Abschätzung der Rezeptorexpression als sogenannter intermediärer Phänotyp die Bestimmung von sCD14 im Serum an.

Über Faktoren, die die Genexpression von Toll-like-Rezeptoren beeinflussen, ist noch nicht sehr viel bekannt. Nach Stimulation dendritischer Zellen mit LPS in vitro konnte eine Hochregulierung der Expression von TLR2, TLR4 und TLR9 beobachtet werden (An et al. 2001). In Muskelzellen sowie in myeloischen Zellen wurde die TLR2-Expression nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor alpha) und anderen Stimuli gesteigert (Matsuguchi et al. 2000; Flo et al. 2001; Watari et al. 2000). Die Genexpression von TLR2 war bei synovialen Fibroblasten, die mit den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  sowie mit LPS und synthetischem Lipopeptid (sBLP) stimuliert wurden, signifikant erhöht (Seibl et al. 2003). Die Expression von TLR4, aber nicht von TLR2, war in einer Studie signifikant hochreguliert bei Patienten, die an SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome) erkrankt waren, einem lebensbedrohlichen Krankheitsbild, das häufig bakteriell ausgelöst wird (Calvano et al. 2003).

Die genannten Untersuchungen deuten darauf hin, dass es einen Zusammenhang zwischen der LPS Exposition und der Genexpression im CD14-TLR2-System zu geben scheint.

### 1.6.5 Die Genetik des CD14-TLR2-Systems in der Entstehung von Atopie

Genetische Kopplungsanalysen haben für die chromosomale Region 5q31-32 eine Verbindung zu Atopie und Asthma identifiziert (Marsh et al. 1994). In dieser Genregion liegt das CD14-Gen, aber mit den Genen für IL3, IL4, IL5, IL9, IL12B, IL13, GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-Colony-Stimulating-Factor) und ADRB2 ( $\beta$ 2-Adrenorezeptor) noch weitere mögliche Kandidatengene für atopische Erkrankungen (Gao et al. 1999).

Baldini et al. identifizierten 1998 einen SNP in der Promoterregion des CD14-Gens, den CD14 C-159T Polymorphismus (Baldini et al. 1999). Bei diesem Polymorphismus kommt es an der Position -159 zum Austausch von Cytosin (C) gegen Thymin (T), so dass bei jeweils zwei Allelen die Genotypen CC (homozygot für den Wildtyp), CT (heterozygot) und TT (homozygot für den Polymorphismus) möglich sind, mit einer Allelfrequenz des C-Allels bei ca. 51%. Es gibt Hinweise auf eine funktionelle Bedeutung des C-159T Polymorphismus im Sinne einer Regulierung der CD14-Transkription in Monozyten. Das Vorhandensein des Polymorphismus

resultierte dabei in einer um 20% gesteigerten CD14-Genexpression nach Stimulation mit Endotoxin (LeVan et al. 2001). Der CD14 C-159T Polymorphismus schien in einer initialen Untersuchung Einfluss auf den sCD14-Spiegel und das Gesamt-IgE im Serum zu haben (Baldini et al. 1999). Es folgten zahlreiche weitere Studien zur Assoziation zwischen dem C-159T Polymorphismus und atopischen Phänotypen sowie IgE, die teils widersprüchliche Resultate ergaben. Die bisherige Datenlage lässt noch keine eindeutige Aussage zur Rolle des C-159T Polymorphismus in der Atopieentstehung zu.

Neben CD14 ist TLR2 als Teil des Signalkomplexes bei der Erkennung einer großen Anzahl von Bestandteilen von Mikroorganismen eines der Kandidatengene für die Atopieentstehung. Es gibt Hinweise darauf, dass Polymorphismen im TLR2-Gen mit Asthma, Atopie und Heuschnupfen sowie spezifischem IgE gegen häufige Aeroallergene assoziiert sein könnten (Eder et al. 2004, Kormann et al. 2008). Bisher liegen hierzu deutlich weniger Studienresultate vor als zur Assoziation von CD14 Polymorphismen mit Atopie.

### 1.7 Die Studien ISAAC, ALEX und PARSIFAL

Seit den achtziger Jahren des 20. Jahrhunderts wurden zahlreiche wissenschaftliche Studien mit Augenmerk auf genetische Faktoren und Umwelteinflüsse in der Entstehung von Asthma und Allergie durchgeführt. Exemplarisch sollen hier die Studien ISAAC, ALEX und PARSIFAL genannt werden, da die Studienpopulationen für die vorliegende Arbeit von Bedeutung sind.

Eine der ersten großen epidemiologischen Studien zur Erforschung atopischer Erkrankungen bei Bevölkerungsgruppen mit unterschiedlichen Lebens- und Umweltbedingungen war die seit 1995 weltweit durchgeführte ISAAC Studie (International Study of Asthma and Allergies in Childhood). Die in der ISAAC Studie erhobenen Daten wurden z.B. über Fragebogenaktionen, Lungenfunktionsmessungen, Blutproben und Hautpricktests in 155 Studienzentren in 56 Ländern gesammelt.

Eine Bevölkerungsgruppe, in deren Wohn- und Lebensraum die Konzentration von LPS konstant erhöht ist, sind Bauern (Radon et al. 2004). Seit Anfang der Neunziger Jahre wurden mehrere Studien mit besonderem Augenmerk auf das Allergierisiko



von Bauernkindern durchgeführt. In diesen Studien werden epidemiologische Daten zur Atopieprävalenz und die Zusammenhänge zwischen LPS Exposition, atopischen Phänotypen und Rezeptoren des angeborenen Immunsystems untersucht.

Die ALEX (Allergy and Endotoxin) Studie war ab 1999 eine der ersten Querschnittsstudien zur Untersuchung von Risikofaktoren und protektiven Faktoren in der Entstehung von Asthma und Allergien mit Schwerpunkt auf der bäuerlichen Lebensweise. Von Bauernkindern und Kontrollkindern aus ländlichen Regionen in Bayern, Österreich und der Schweiz bzw. ihren Eltern wurden u.a. Fragebögen zu Lebensstil und Umweltbedingungen erhoben und Hautpricktests, Blutproben sowie Endotoxinmessungen im Hausstaub ausgewertet.

Eine weitaus größere Bauernstudie ist die ab dem Jahr 2000 in fünf europäischen Ländern durchgeführte PARSIFAL Studie (Prevention of Allergy Risk Factors for Sensitization In children related to Farming and Anthroposophic Lifestyle). Kinder aus Familien mit traditionellem Lebensstil (Bauernfamilien und anthroposophisch geprägten Familien) und Kontrollkinder aus denselben Regionen wurden in Deutschland, Holland, Österreich, Schweden und der Schweiz rekrutiert. Wie in der ALEX Studie wurden epidemiologische Daten über Fragebögen erhoben, die auf den Fragebögen der ISAAC Studie basierten. Zudem wurden u.a. Blutproben, Lungenfunktionsmessungen, Hautpricktests und Endotoxinmessungen aus Hausstaub und Stall gesammelt.

In den letzten Jahren wurden weitere Bauernstudien lanciert, die hier nicht namentlich erwähnt werden sollen.

### 1.8 Zusammenfassung

Die Prävalenz atopischer Erkrankungen hat in den letzten Jahrzehnten weltweit zugenommen. Im Kindesalter gehören Allergien und Asthma zu den häufigsten chronischen Erkrankungen mit stetig ansteigender Prävalenz. Die genetische Prädisposition, Veränderungen in den Umweltbedingungen und Interaktionen von Genetik und Umwelt scheinen hierbei eine entscheidende Rolle zu spielen. Besonders die Exposition gegenüber Endotoxin (LPS) scheint ein Umweltfaktor zu sein, der Einfluss auf die Entstehung atopischer Erkrankungen haben könnte. Auf molekularer Ebene erfolgt die Erkennung von LPS innerhalb des angeborenen Immunsystems über das Zusammenspiel der Mustererkennungsrezeptoren CD14 und TLR2. CD14 und TLR2 sind mögliche Kandidatengene für die Entstehung von Atopie und Asthma. Genetische Variationen im CD14-TLR2-System scheinen eine Assoziation mit der Entstehung atopischer Erkrankungen aufzuweisen. Deshalb sind diese Gene Gegenstand zahlreicher Analysen zur Erforschung genetischer Ursachen atopischer Erkrankungen sowie von Gen-Gen- und Gen-Umwelt-Interaktionen.

Agrund der biologischen Komplexität der Regelkreise sollten stets beide Gene des CD14-TLR2-Rezeptorsystems in einer Population untersucht werden. Bei so komplexen Erkrankungen wie Asthma und Allergien besteht sonst die Gefahr, dass vorhandene Zusammenhänge nicht erkannt werden könnten.

Zur Untersuchung von Gen-Gen-Interaktionen im CD14-TLR2-System eignen sich vor allem Studienpopulationen wie die der ISAAC Studie, die aus einer großen Anzahl von Individuen mit ähnlichem genetischem Hintergrund bestehen und unter vergleichbaren Umweltbedingungen leben. Populationen aus den Bauernstudien bieten sich hingegen zur Analyse des Zusammenhangs zwischen dem Ausmaß der mikrobiellen Exposition und der Entstehung atopischer Erkrankungen im Sinne von Gen-Umwelt-Interaktionen an.

### 1.9 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Das CD14-TLR2-System spielt eine wesentliche Rolle in der Erkennung von Bestandteilen mikrobieller Erreger wie z.B. LPS. Es gibt Hinweise darauf, dass genetische Variationen im CD14-TLR2-Rezeptorsystem mit dem Auftreten von atopischen Erkrankungen assoziiert sind.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, Polymorphismen im CD14-TLR2-System auf ihre Assoziation mit atopischen Erkrankungen zu untersuchen. Im ersten Teil der Analysen soll zuerst der Hypothese nachgegangen werden, dass der Polymorphismus C-159T in der Promoterregion des CD14-Gens eine Rolle in der Ausprägung atopischer Phänotypen spielt. Zu dieser Fragestellung werden drei verschiedene Populationen verschiedenen Lebensalters aus unterschiedlichen Regionen Deutschlands untersucht. Weiterhin soll in diesen drei Populationen die Assoziation zwischen dem Genotyp des CD14 C-159T Polymorphismus und sCD14 als indirektem Marker der Genexpression von CD14 geprüft werden. Zudem soll festgestellt werden, ob in den drei Populationen ein Effekt des Genotyps des CD 14 C-159T Polymorphismus auf die Serumspiegel von IgE besteht.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit soll die in einer Voruntersuchung vorbeschriebene starke Assoziation zwischen dem TLR2-Polymorphismus TLR2-540 und atopischen Phänotypen an der Population der PARSIFAL Studie getestet werden. Mit einer Replikationsuntersuchung soll die Rolle des TLR2-540 Polymorphismus als wesentliche Determinante von Asthma und Allergien bei Bauernkindern bestätigt werden.

Die für diese Arbeit durchgeführten Analysen sollen eine Ergänzung zur bisherigen Datenlage aus anderen Untersuchungen an den Populationen der Studien ISAAC und PARSIFAL darstellen. Ziel ist es, dass für beide Populationen Daten zur Assoziation von genetischen Varianten im CD14-TLR2-System mit atopischen Phänotypen existieren.

### 2. Material und Methoden

#### 2.1 Geräte

Gel-Dokumentationssystem:

KODAK Electrophoresis Documentation and Analysis System	KODAK, Stuttgart (Wangen), D
---	------------------------------

Gel-Elektrophoreseapparatur:

BIO RAD Wide Mini-Sub Cell GT	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
-------------------------------	---

BIO RAD Power Pac 300	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
-----------------------	---

Massenspektrometer:

BIFLEX II-TOF	Bruker Franzen Analytik GmbH, Bremen, D
---------------	---

Mikrowelle:

Bosch, Stuttgart, D

PCR-Systeme:

eppendorf Mastercycler	Eppendorf AG, Hamburg, D
PCR PTC 225 Tetrad, Peltier Thermal Cycler	MJ Research, Boston, MA, USA
Primus Thermal Cycler	MWG-Biotech AG, Ebersberg, D

Photometer:

eppendorf BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg, D
-------------------------	--------------------------

Pipetten:

eppendorf Research 10µl, 20µl, 200µl, 1000µl	Eppendorf AG, Hamburg, D
--	--------------------------

Pipettierroboter:

Pipettierroboter Genesis 150	Tecan AG, Crailsheim, D
Pipettierroboter Multimek 96	Beckmann/Sagoin, Unterschleißheim, D

Sequenom Spectro Point Nanoliter	Sequenom, Hamburg, D
----------------------------------	----------------------

Pipetting Systems

Pipettierroboter Te-MO	Tecan AG, Crailsheim, D
------------------------	-------------------------

### Vortexer:

Scientific Industries Vortex Genie 2

Scientific Industries Inc., Bohemia,  
NY, USA

### Tischzentrifuge:

Hettich Zentrifugen Mikro 20

Hettich GmbH, Tuttlingen, D

### Waage:

Kern 440-33

Kern, Ballingen, D

### Wasserbad:

Köttermann Labortechnik

Köttermann GmbH, Uelze, D

### Zentrifuge:

Eppendorf Centrifuge 5810 R

Eppendorf AG, Hamburg, D

## 2.2 Computerprogramme

### Pipettierroboter:

Gemini 3.5

Tecan AG, Crailsheim, D

Bioworks

Beckmann Coulter, Fullerton, USA

### MALDI-TOF Massenspektrometrie:

Spectro TYPER\_RT 2.0.0.3

SEQUENOM, San Diego, CA, USA

- Spectro-Designer
- Spectro-Importer
- Spectro-Typer

### Datenbanken aus dem Internet:

National Center for Biotechnology Information

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

CHIP Bioinformatics Tools

<http://snpper.chip.org/bio/>

Innate Immunity Programs for Genomic

<http://innateimmunity.net>

Applications IIPGA

### Statistikprogramme:

SAS version 8.2

SAS Institute GmbH, Heidelberg, D

SPSS version 10.0

SPSS Inc., Chicago, IL, USA

Stata/SE 10.0	Stata Corporation, College Station, Texas, USA
Microsoft Office für Windows XP: Microsoft Excel Microsoft Word Microsoft Power Point	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, D
Adobe Acrobat Reader Version 7.0	Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA
Adobe Photoshop Version 7.0	Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA

### 2.3 Puffer, Lösungen und Reagenzien

#### 2.3.1 Puffer, Lösungen und Reagenzien für die DNA Extraktion

Erythrozytenlysepuffer mit pH 7,4: 155 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Merck Darmstadt, Deutschland), 10 mM  $\text{KHCO}_3$  (Sigma-Aldrich, Osterode, Deutschland), 0,5 M EDTA mit pH 8 (Sigma-Aldrich, Osterode, Deutschland), destilliertes  $\text{H}_2\text{O}$ .

Proteinase K Puffer: 1 M Tris-HCl mit pH 7,5 (Sigma-Aldrich, Osterode, Deutschland), 0,5 M EDTA mit pH 8,0 (Sigma-Aldrich, Osterode, Deutschland), 5 M NaCl (Sigma-Aldrich, Osterode, Deutschland).

SDS 20% (Na-Dodecylsulfat, Serva, Heidelberg, Deutschland).

Ethanol 100% (Merck, Darmstadt, Deutschland).

TE Puffer: 10 mM Tris-HCl (Sigma-Aldrich, Osterode, Deutschland), 1 mM EDTA mit pH 8 (Sigma-Aldrich, Osterode, Deutschland), destilliertes  $\text{H}_2\text{O}$ .

### 2.3.2 Puffer, Lösungen und Reagenzien für die PCR und RFLP-Analyse

10 x Taq Puffer	Promega GmbH, Mannheim, D
dNTP Mix	Promega GmbH, Mannheim, D
10x NEBuffer mit pH 7,9 bei 25 °C: 500 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, MgCl <sub>2</sub> , 1 mM Dithiothreitol	New England Biolabs, Frankfurt am Main, D
10x Puffer S	PeqLab, Erlangen, D
10x Puffer Y	PeqLab, Erlangen, D
25mM MgCl <sub>2</sub>	Promega GmbH, Mannheim, D
Betain 5 M	Sigma-Aldrich, Osterode, D
H <sub>2</sub> O Water Molecular Biology Grade	Eppendorf AG, Hamburg, D
dNTP-Set, je 100 mM	PeqLab, Erlangen, D

### 2.3.3 Puffer, Lösungen und Reagenzien für die Gel-Elektrophorese

100 bp DNA-Leiter 500 µg/ml	New England Biolabs, Frankfurt am Main, D
Agarose	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Osterode, D

Loading dye: Glycerin 30%, Bromphenolblau, Xylenecyanol-FF.

5 % TBE-Puffer (54 g Tris-Puffer, 27,5 g Borsäure, 20 ml 0,5 M EDTA mit pH 8, 1000 ml destilliertes H<sub>2</sub>O).

### 2.3.4 Puffer, Lösungen und Reagenzien für die MALDI-TOF Massenspektrometrie

10 x PCR Puffer containing 15mM MgCl <sub>2</sub>	Qiagen, Hilden, D
4 x dNTPs	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D
25 mM MgCl <sub>2</sub>	Qiagen, Hilden, Deutschland
MassExtend Nucleotide Mix Pack Tri 25	SEQUENOM, San Diego, CA, USA
MassExtend Nucleotide Mix Pack Tri 26	SEQUENOM, San Diego, CA, USA
MassExtend Nucleotide Mix Pack Tri 28	SEQUENOM, San Diego, CA, USA
HME MassExtend Nucleotide Tri-Mix-Pack	SEQUENOM, San Diego, CA, USA
3-Punkt Kalibrant	SEQUENOM, San Diego, CA, USA
hME-Puffer	SEQUENOM, San Diego, CA, USA
SpectroClean	SEQUENOM, San Diego, CA, USA

### 2.4 Reaktionskits

#### PCR-Aufreinigung:

Millipore Kit PCR Multiscreen,  
Montage 96PCR Plates  
QIAquick Gel Extraction Kits

Millipore, D  
Qiagen, Hilden, D

#### MALDI-TOF Massenspektrometrie:

MassExtend Core Kit

SEQUENOM, San Diego, CA, USA

IMMULITE Total IgE

DPC Biermann, Bad Nauheim, D



### 2.5 Enzyme

Proteinase K	Sigma-Aldrich, Osterode, D
Taq-Polymerase	Promega GmbH, Mannheim, D
Hae III	New England Biolabs, Frankfurt am Main, D
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	Amersham Bioscience, Freiburg, D
HotStar Taq (5units/µl)	Quiagen, Hilden, D

### 2.6 Primer

CD14 Primer Forward und Reverse Metabion GmbH, Planegg/Martinsried, D  
(siehe Tabelle 2)

Primer für MALDI-TOF

Massenspektrometrie:

Sense-, Antisense- und Extensions-  
Primer (siehe Tabelle 5) Metabion GmbH, Planegg/Martinsried, D

Primer für die PEP:

N-15 Primer Metabion GmbH, Planegg/Martinsried, D

### 2.7 Sonstige Materialien

Thermo-Fast 96 PCR Plates (Low Profile)	Peqlab, Erlangen, D
Thermofast 384 MTP	ABgene, Surrey, UK
96-er Clusterplates	Qiagen, Hilden, Deutschland

Einwegküvetten "Uvette"

Eppendorf AG, Hamburg, D

### 2.8 Probanden

Eine schriftliche Einverständniserklärung aller Probanden und der Eltern aller untersuchten Kinder lag vor. Alle durchgeführten Untersuchungen wurden von den zuständigen Ethikkommissionen genehmigt.

#### 2.8.1 Kinder aus der ISAAC Studie

In den Jahren 1995 und 1996 wurden Kinder in München und Dresden im Rahmen der ISAAC Studie (International Study of Asthma and Allergies in Childhood) rekrutiert. Die Untersuchungen wurden auf der Grundlage von randomisierten Stichproben vorgenommen. In München wurden 3679 Erstklässler (Alter 5 bis 7 Jahre) und 3830 Viertklässler (Alter 9 bis 11 Jahre) in diese Querschnittsstudie eingeschlossen. In Dresden nahmen 3668 Viertklässler an der Studie teil.

In beiden Studienstädten wurden an die Teilnehmer über die Schulen Fragebogen verteilt, in dem die Eltern angaben, ob ihr Kind an Asthma, Heuschnupfen oder atopischem Ekzem leidet. Es wurden Hautpricktests gegen sechs häufige Aeroallergene (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *D. farinae*, Katzenhaar, *Alternaria tenuis*, Baum- und Gräserpollen) durchgeführt.

Blutproben für DNA Untersuchungen (Genotypisierung) und IgE-Messungen wurden über Venenpunktion gewonnen. Bei den Viertklässlern wurden zudem noch Lungenfunktionstests durchgeführt.

In unsere Analysen wurden nur Kinder deutscher Abstammung mit erfolgreicher Genotypisierung eingeschlossen, für die auch die IgE-Messergebnisse vorlagen. Das war der Fall bei 256 Münchner Erstklässlern, 1087 Münchner Viertklässlern und 705 Dresdner Viertklässlern.

Für die Messung von sCD14 wurden Subgruppen von 186 Münchner Viertklässlern und 170 Dresdner Viertklässlern selektiert, wobei die Anzahl der positiven Hautpricktests für beide Gruppen gleich war.

### 2.8.2 Definition der Phänotypen in der ISAAC Studie

„Asthma“ wurde definiert als ärztliche Diagnose von Asthma oder rezidivierender asthmatischer oder spastischer Bronchitis. Auch die Definitionen von Heuschnupfen und atopischem Ekzem basierten auf dem Bericht der Eltern über eine vorangegangene ärztliche Diagnose dieser Erkrankungen.

Das Vorliegen von Atopie wurde definiert als eine positive Reaktion (Quaddel mit mindestens 3 mm Durchmesser nach Subtraktion der Negativkontrolle) in mindestens einem Hautpricktest gegen sechs häufige Allergene (Dermatophagoides pteronyssinus, D. farinae, Katzenhaar, Alternaria tenuis, Baum- und Gräserpollen).

### 2.8.3 Erwachsene aus Gießen

Im Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der Universität Gießen unter der Leitung von Prof. Dr. Bein wurden 888 gesunde, erwachsene Probanden selektiert. Bei einer zufällig ausgewählten Subgruppe wurden Genotypisierungen für den C-159T Polymorphismus im CD14-Gen durchgeführt, IgE und sCD14 bestimmt sowie anamnestische Daten zu atopischen Erkrankungen über Fragebögen und Anamnesegespräche erhoben.

### 2.8.4 Kinder aus der PARSIFAL Studie

Die PARSIFAL Studie (Prevention of Allergy Risk Factors for Sensitization In children related to Farming and Anthroposophic Lifestyle) wurde in den Jahren 2000 bis 2002 in fünf europäischen Ländern durchgeführt (Deutschland, Schweiz, Schweden, Niederlande, Österreich). Es wurden fünf- bis dreizehnjährige Kinder aus Bauernfamilien (n=2823), Familien mit anthroposophischem Lebensstil (n=4606) und entsprechenden Kontrollkollektiven (5440 Kinder aus ländlichen Regionen und 2024 Stadtkinder) rekrutiert (Alfvén et al. 2006). Über die Schulen wurden detaillierte Fragebögen zur Selbstauskunft an die Eltern der Kinder verteilt, in denen Informationen zu Umwelteinflüssen, Lebensstil, sozioökonomischen Bedingungen, stattgehabten Infektionen, Ernährung, Kontakt zu Haus- und Nutztieren sowie Asthma und atopischen Erkrankungen abgefragt wurden. Der Großteil der Fragen

basierte auf den international validierten und übersetzten ISAAC Phase II Fragen (Asher et al. 1995) und der schwedischen BAMSE Studie (Wickman et al. 2002). Die Fragen zur Exposition gegenüber Umweltfaktoren und zum Lebensstil der Bauernfamilien entsprachen hauptsächlich denen der ALEX Studie in Deutschland, Österreich und der Schweiz (Riedler et al. 2001).

In Schweden, den Niederlanden und Österreich wurden alle Kinder mit ausgefüllten Fragebögen, in Deutschland und der Schweiz wegen der großen Zahl eingeschlossener Kinder nur eine Zufallsauswahl zu klinischen Untersuchungen und Blutabnahmen für IgE-Messungen und genetische Analysen eingeladen (Alfvén et al. 2006). Die Messung von spezifischem IgE gegen inhalative und Nahrungsallergene wurde zentral in Schweden durchgeführt. Es erfolgten hierbei Messungen für die inhalativen Allergene von Hausstaubmilben (*Dermatophagoides pteronyssinus* und *Dermatophagoides farinae*), Pollen von Birke, Wiesenlieschgras und Beifuß, sowie von Katze, Hund, Pferd und dem Schimmelpilz *Cladosporium herbarum*. Im Nahrungsmittelmix (FX5) waren die Allergene von Hühnereiweiß, Kabeljau, Kuhmilch, Erdnuss, Sojabohne und Weizenmehl enthalten.

Unsere Analysen beschränkten sich auf eine Subpopulation von Kindern im Alter von 5 bis 13 Jahren bekannten Geschlechts, bei denen eindeutig zuzuordnen war, ob es sich um ein Bauernkind oder ein Kontrollkind aus denselben ländlichen Regionen handelte. Die Kinder mussten aus dem jeweiligen Land stammen. Es musste eine Einverständniserklärung der Eltern für genetische Analysen und eine adäquate Probe der DNA vorliegen. Bei Teilnahme von Geschwistern wurde nur jeweils das älteste Kind einer Familie eingeschlossen. Die endgültige Population für unsere Analysen umfasste 1539 Kinder aus der PARSIFAL Studie.

### 2.8.5 Definition der Phänotypen in der PARSIFAL Studie

Für die PARSIFAL Studie wurden dieselben Definitionen der Phänotypen wie für die frühere ALEX Studie verwendet. „Asthma“ wurde definiert als ärztliche Diagnose von Asthma oder rezidivierender asthmatischer, spastischer oder obstruktiver Bronchitis. Das Vorliegen von pfeifenden oder keuchenden Atemgeräusche in den letzten 12 Monaten wurde als „aktuell Giemen“ bzw. „aktuelle Symptome von Asthma“ bezeichnet.

Als „aktuelle Heuschnupfensymptome“ wurde eine positive Antwort auf die Frage „Hatte Ihr Kind in den letzten 12 Monaten Niesanfälle oder eine laufende, verstopfte oder juckende Nase, obwohl es nicht erkältet war?“ klassifiziert. „Aktuell Ekzem“ wurde definiert als intermittierender juckender Ausschlag mit Lokalisation in den Ellbeugen, Kniekehlen, an Hand- oder Fußgelenken, Oberschenkeln, Gesicht oder Hals über mindestens sechs Monate im letzten Jahr.

Bei den Messungen von spezifischem IgE im Serum gegen die oben genannten Allergene wurde ein Schwellenwert von  $\geq 3,5$  kU/l für die Definition eines erhöhten spezifischen IgE-Spiegels und für die Definition des Phänotyps „Atopie“ verwendet.

### 2.9 Experimentelle Methoden

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde zum größten Teil im Allergogenetischen Labor im Forschungszentrum Kubus am Dr. von Haunerschen Kinderspital der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von PD Dr. Michael Kabesch durchgeführt. Hier erfolgten die DNA Extraktion der Blutproben aus der ISAAC Studie und der PARSIFAL Studie, die Genotypisierungen für den CD14 C-159T und den TLR2-540 Polymorphismus und die Messung von IgE im Serum für die Proben aus der ISAAC Studie. Die Genotypisierung für den TLR2-540 Polymorphismus mit der MALDITOF-Methode erfolgte in Zusammenarbeit mit dem GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit in München (heute Helmholtz Zentrum München). Die Protokolle der im Allergogenetischen Labor angewandten experimentellen Methoden wurden von allen Doktoranden der Arbeitsgruppe in einem Dokument gesammelt. Die sCD14-Messungen für die Proben aus der ISAAC Studie erfolgten im Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der Universität Gießen unter der Leitung von Prof. Dr. Bein.

Die Genotypisierung für die weiteren Polymorphismen im TLR2-Gen erfolgte für die Proben aus der PARSIFAL Studie im Arizona Respiratory Center in Tucson, USA.

Die Messungen des spezifischen IgE im Serum wurden zentral im Department of Clinical Immunology des Karolinska Universitätsklinikums in Stockholm in Schweden durchgeführt.

### 2.9.1 DNA Extraktion

Die Extraktion der DNA erfolgte nach der Aussalzmethode (Miller et al. 1988) durch die Mitarbeiter des Asthmagenetischen Labors am Dr. von Haunerschen Kinderspital in München. Die erforderlichen Puffer (Erythrozytenlysepuffer, Proteinase K Puffer und TE Puffer) wurden im Asthmagenetischen Labor hergestellt, autoklaviert und der pH durch Titration mit HCl eingestellt.

Zur Extraktion der DNA wurden je 4,5 ml mit EDTA antikoaguliertes Vollblut verwendet. Die roten Blutzellen wurden lysiert und der Überstand nach Zentrifugation entfernt. Dieser Lysevorgang wurde noch einmal wiederholt und danach die Leukozyten resuspendiert. Nach Zugabe von je 1 ml Proteinase K Puffer wurden die Proben bei -80° C eingefroren. Zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei Raumtemperatur aufgetaut. Es wurden je 5 µl Proteinase K (20 mg/ml) und 50 µl 20% SDS zugegeben. Die Proben wurden über Nacht bei 37° C im Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 5 M NaCl wurde zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Die DNA wurde mit 100% Ethanol ausgefällt, mit der Pipette aufgenommen und in einem neuen Probengefäß mit 70% Ethanol gewaschen. Nach Entfernen der Flüssigkeit trocknete die DNA im offenen Röhrchen an der Luft und wurde anschließend in 50 µl TE Puffer gelöst.

### 2.9.2 Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

Nach der DNA Extraktion wurde die Konzentration der Nukleinsäure in der Lösung bestimmt. Hierzu wurde die Extinktion im Spektralphotometer bei 260 nm und 280 nm gemessen und die Konzentration nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz berechnet. Das Verhältnis der Extinktion bei 260 nm zu derjenigen bei 280 nm sollte im Idealfall zwischen 1,7 bis 2,0 betragen. Niedrigere Werte deuten auf Verunreinigungen oder einen zu hohen Proteingehalt hin.

### 2.9.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

#### 2.9.3.1 Theoretische Grundlagen

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) macht die selektive Vermehrung spezifischer Nukleinsäure-Sequenzen definierter Länge möglich. Die Komponenten des Reaktionsansatzes zur zyklischen Amplifikation der DNA-Fragmente sind neben der DNA-Vorlage (Template) zwei spezifische Oligonukleotidprimer ("Forward Primer" und "Reverse Primer"), das Enzym Taq-Polymerase und die vier Desoxynukleotidtriphosphate dATP (A), dCTP (C), dGTP (G) und dTTP (T) als Nukleotidmischung (dNTP Mix). Die Template-DNA wird zunächst bei 95° C denaturiert, um in der darauffolgenden Annealingphase das Anheften der Primer an die Zielsequenzen der entstandenen Einzelstränge zu ermöglichen. Die Temperatur in der Annealingphase hängt vom A/T- und C/G-Gehalt der Primer ab und ist für die Spezifität der PCR von entscheidender Bedeutung. Die hitzestabile Taq-Polymerase mit dem Temperaturoptimum von 72° C verlängert die Primer in 3'-Richtung unter Verbrauch der Desoxynukleotide. Der gesamte Zyklus - Denaturieren, Anlagerung der Primer und Strangsynthese - wird 35 mal wiederholt. Es kommt zu einer exponentiellen Vermehrung des definierten DNA-Stückes, da die neu entstandenen Stränge ebenso als Vorlage für den nächsten Zyklus dienen. Das Reaktionsgemisch enthält damit am Ende von n Runden ein theoretisches Maximum von  $2^n$  doppelsträngigen Kopien der gewünschten DNA-Sequenz.

#### 2.9.3.2 Experimentelle Durchführung

Ein PCR-Ansatz wurde nach dem in Tabelle 2 beschriebenen Schema vorbereitet und die PCR über 35 Zyklen unter den in Tabelle 3 aufgeführten Temperatur Bedingungen in einem Thermocycler (Mastercycler, Firma Eppendorf) durchgeführt.

Zur Kontrolle von evtl. vorhandenen Kontaminationen wurden zusätzlich zu den DNA-Proben wurden bei jedem Lauf des Thermocyclers eine Positiv- und eine Negativkontrolle eingesetzt. Für die Positivkontrolle diente eine Standard-DNA als Vorlage (Template). Die Negativkontrolle enthielt alle Komponenten des PCR-Ansatzes außer dem DNA Template.

Komponenten	Volumen
DNA Template	2,0 µl
dNTP Mix	0,5 µl
CD 14 Forward Primer 5'-GTGCCAACAGATGAGGTTTCAC-3'	0,5 µl
CD 14 Reverse Primer 5'-CCTCTGTGAACCCTGATCAC-3'	0,5 µl
10 x Promega Taq Puffer	2,5 µl
Promega Taq-Polymerase	0,1 µl
H <sub>2</sub> O	16,9 µl

**Tabelle 2. Komponenten des PCR-Ansatzes.**

Temperatur	Zeit
96° C	2 min
96° C	30 sec
60° C	30 sec
72° C	40 sec
72° C	5 min
4° C	halten

**Tabelle 3. Temperaturbedingungen der PCR-Reaktion.**

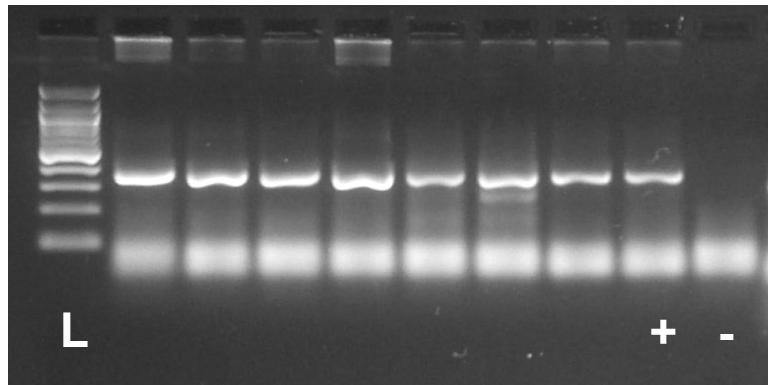
Das PCR-Produkt, d.h. die amplifizierte DNA, wurde im Kühlschrank bei 4° C aufbewahrt.



### 2.9.4 Gel-Elektrophorese von Nukleinsäuren im Agarose-Gel

Die elektrophoretische Auftrennung im Agarose-Gel diente der Identifizierung des PCR-Produktes und Kontrolle von DNA-Qualität und PCR-Reaktion. Das Prinzip beruht auf der Tatsache, dass Nukleinsäuren unter neutralen pH-Bedingungen negative Ladungen besitzen und somit im elektrischen Feld wandern, wobei ihre Geschwindigkeit proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes ist. Für die Gele zur Auftrennung des PCR-Produktes wurde Agarose in einer Konzentration von 2,5% verwendet. Die Agarose wurde in 0,5x TBE Puffer im Mikrowellenherd aufgekocht und bei einer Temperatur von ca. 60° C in einen horizontalen Geltrog gegossen. Um die DNA-Banden im Agarosegel sichtbar zu machen, wird in die Gele Ethidiumbromid eingegossen. Diese Substanz interkaliert in die DNA-Moleküle, wodurch die Fluoreszenz im UV-Licht um ein Vielfaches erhöht wird. Im Anschluss an die Elektrophorese kann so eine unmittelbare visuelle Auswertung im UV-Licht (302 nm) erfolgen. Bis zum vollständigen Erstarren des Gels wird ein Kamm in den Geltrog eingesetzt. Dadurch entstehen Vertiefungen im Gel, die später als Probenaschen zur Auftrennung der DNA dienen. Das erkaltete Gel wurde in eine mit TBE Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gegeben.

Zum Beladen des Gels wurden je 10 µl des PCR-Produkts mit 3 µl Loading dye vermischt und in eine Probenasche des Gels pipettiert. Auch die Positiv- und Negativkontrolle der PCR-Reaktion wurden mit Loading dye auf das Gel aufgetragen. In die äußeren Probenaschen wurde eine Basenpaar-Leiter ("Ladder") als Längenstandard gegeben. Durch den Vergleich mit der Ladder konnte die Länge der DNA-Moleküle abgeschätzt werden. Bei einer Stromstärke von 400 mA wurde eine Spannung von 70 V angelegt und die Elektrophorese eine Stunde lang durchgeführt. Danach wurde das Gel aus der Elektrophoresekammer genommen und bei 302 nm fotografiert. Ein Beispiel eines solchen Fotos aus unserer Versuchsreihe ist in Abbildung 3 dargestellt.



**Abbildung 3. Gel-Elektrophorese des PCR-Produktes im Agarose-Gel.**

Abkürzungen: L : Ladder (Basenpaar-Leiter als Längenstandard), + : Positivkontrolle, - : Negativkontrolle.

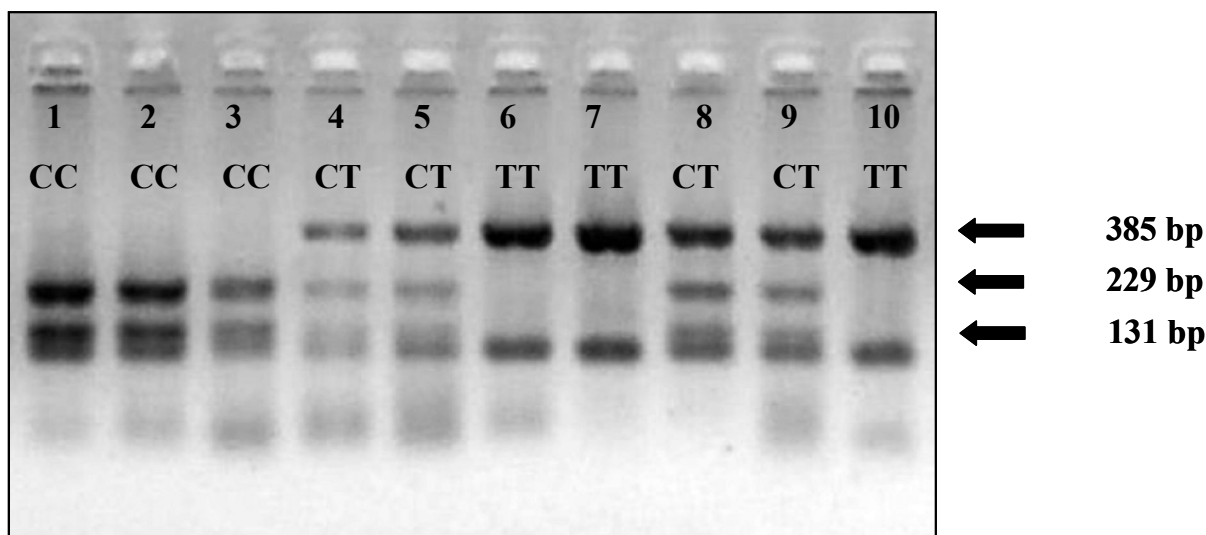
### 2.9.5 Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus-Analyse (RFLP)

Die Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus-Analyse (RFLP) ist eine Methode zur Analyse von Einzelbasenaustauschen, sogenannten SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms). Ein SNP ist eine Variation der DNA-Sequenz, die durch den Austausch eines einzelnen Nukleotides (A,T,C oder G) entsteht. So beruht der untersuchte Polymorphismus CD14 C-159T auf einem Austausch von C gegen T am Basenpaar der Position -159. Restriktionsenzyme sind Endonukleasen, die spezifische Sequenzen einer doppelsträngigen DNA erkennen und deren Phosphodiester-Bindungen an definierter Stelle spalten.

Das hier verwendete Restriktionsenzym Hae III erkennt die Sequenz GG↓TT und schneidet sie wie durch den Pfeil dargestellt. Der Puffer 10x NEBuffer 2 enthält 500 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 mM Dithiothreitol bei einem pH von 7,9 bei 25° C.

Zu 15 µl PCR-Produkt wurden 5,5 µl H<sub>2</sub>O, 2,3 µl NEBuffer 2 und 0,2 µl des Restriktionsenzym Hae III gegeben. Der Ansatz wurde bei 37° C über Nacht inkubiert. Die Schnittprodukte wurden auf ein 2,5 % Agarose-Gel aufgetragen, und eine Elektrophorese wurde unter den oben beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Durch die unterschiedliche Länge der Schnittprodukte entstanden unterschiedliche Bandenmuster für die verschiedenen Genotypen, wodurch die Genotypisierung möglich war. Abbildung 4 zeigt einen Ausschnitt aus einem Foto der Genotypisierung mittels Gel-Elektrophorese aus unserem Datensatz. Die

Bezeichnungen CC, CT und TT entsprechen den Allelen bzw. den Genotypen für den CD14 C-159T Polymorphismus.



**Abbildung 4. Genotypisierung mittels Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus-Analyse (RFLP) und Gel-Elektrophorese.**

Abkürzungen: CC : homozygot Wildtyp für den C-159T SNP, CT : heterozygot, TT : homozygot für den C-159T SNP.

### 2.9.6 Genotypisierung mit der MALDI-TOF Massenspektrometrie

(adaptiert aus Lenz et al. 2006)

#### 2.9.6.1 Theoretische Grundlagen

MALDIMS ("Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometrie") wurde erstmals 1988 von Hillenkamp und Karas beschrieben (Karas and Hillenkamp 1988). Bei dieser Methode wird die zu untersuchende Probe (der Analyt) in eine Matrix eingebettet und damit kokristallisiert. Danach wird die Mischung aus Analyt und Matrix im Hochvakuum des Massenspektrometers einem intensiven Laserimpuls von wenigen Nanosekunden Dauer ausgesetzt (Karas and Hillenkamp 1988; Kirpekar et al. 1998).

Für den Vorgang der Desorption/Ionisation werden verschiedene Modelle diskutiert, jedoch gilt der Prozess bis heute als nicht vollständig aufgeklärt. Vermutlich werden bei der Übertragung der Laserenergie auf die in der Matrix eingebetteten

Probenmoleküle hauptsächlich einfach geladene Molekülionen erzeugt, welche in die Gasphase übertreten (Hillenkamp et al. 1991).

Der TOF-Analysator (**T**ime **O**f **F**light) ist ein Flugzeitmassenspektrometer, mit dem man die Masse der Molekülionen bestimmen kann. Alle Ionen werden in einem elektrischen Feld auf das gleiche Potential beschleunigt und erreichen über ein Flugrohr einen Detektor abhängig von ihrem jeweiligen Quotienten aus Masse und Ladungsverhältnis zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Griffin 2000).

Durch die MALDI-TOF Massenspektrometrie wurden effektive Hochdurchsatzmethoden entwickelt, mit deren Hilfe DNA-Variationen im Erbgut schnell und präzise detektiert werden können (Gohlke 2004; Griffin 2000; Storm et al. 2003; Leushner 2001; Pusch et al. 2002).

Die Genotypisierung für SNP erfolgt dabei durch die Primer-Extensions-Reaktion. Hierfür wird zunächst der genomische Bereich, in dem sich der SNP befindet, mittels PCR amplifiziert, sodass PCR-Produkte mit einer Grösse von ca. 100 Basenpaaren entstehen. Durch eine Primer-Verlängerung (Primer-Extension) entstehen SNP-spezifische Primer-Extensionsprodukte, die sich aufgrund ihres unterschiedlichen Gewichts massenspektrometrisch unterscheiden lassen (Griffin 2000).

Die SNP-spezifische Extension nach der hME-Methode (Homogeneous-Mass-Extent<sup>TM</sup>) wird für die Bestimmung von Allelfrequenzen und für die Einzelgenotypisierung auf Platten für 384 Reaktionen angewendet (Little et al. 1997; Hartmer et al. 2003; Ding and Cantor 2003).

### 2.9.6.2 Primer Extension Preamplification (PEP)

Durch die Mitarbeiter des Allergogenetischen Labors in München wurde im Rahmen einer anderen Untersuchung bei den Proben für die vorliegende Arbeit die Methode der „Primer Extension Preamplification“ (PEP) angewendet. Damit konnte der DNA-Gehalt jeder Probe auf eine Konzentration von 20 ng/µl erhöht werden.

Das Verfahren der PEP wurde erstmals im Jahre 1992 von Zhang et al. beschrieben (Zhang et al. 1992). Es handelt sich dabei um eine PCR, in die eine Mischung unterschiedlicher Primer mit einer jeweiligen Länge von 15 Basen, so genannte N15-Primer, eingesetzt wird. Die Basenabfolge ist dabei randomisiert. Aufgrund der unspezifischen Sequenz dieser Primer kommt es bei der PEP-Reaktion zur zufälligen

Anlagerung am gesamten komplementären DNA-Strang der eingesetzten Probe. Die Amplifikation findet dann zwischen den benachbarten, an den DNA-Strang angelagerten Primern statt. Die Regionen zwischen den Primern variieren in der Länge und können zum Teil auch überlappen. Da die Primer sich zufällig über den ganzen DNA-Strang verteilen, ist es mit dieser Methode möglich, das gesamte Genom zu amplifizieren. Mit einer 40-fachen Steigerung der DNA-Menge kann gerechnet werden.

### 2.9.6.3 Vorbereitung der Platten für die MALDI-TOF

In einem Verdünnungsschritt (1:20) wurden die einzelnen Proben mit einem DNA-Gehalt von 1 ng/µl auf 96-er Clusterplates (Mutterplatten) überführt. Vier solcher Mutterplatten wurden zu einer 384-er Platte (Tochterplatte) nach einem vorgegebenem Schema zusammengefasst.

Dabei wurden je 5 µl DNA (1 ng/µl) von der Mutterplatte auf die Tochterplatte mit Hilfe einer Pipettierstation überführt und bei Raumluft über Nacht getrocknet. Nach der Trocknung betrug die Gesamtkonzentration je Probe 5 ng.

Die so hergestellten Tochterplatten wurden in den weiteren Arbeitsschritten im Rahmen der Genotypisierung mittels MALDI-TOF verwendet.

### 2.9.6.4 PCR im Rahmen der hME-Methode für die MALDI-TOF

Vor der Primer-Extensions-Reaktion erfolgte eine Amplifikation des um den zu untersuchenden SNP liegenden genomischen Bereichs mittels PCR. Dabei wiesen die verwendeten „Sense“- und „Antisense“-Primer neben dem sequenzspezifischen Bereich jeweils ein zusätzliches Sequenzmotiv von zehn Basen, den sogenannten „Tag“, auf. Der „Tag“ führt dazu, dass die Amplifikationsreaktion gleichmäßiger verläuft, wenn mehrere PCR-Reaktionen in einem Reaktionsgefäß stattfinden. Zudem erhöht der „Tag“ die Masse der Primer, damit sie bei der MALDI-TOF Analyse nicht im Massenbereich der Primer-Extensionsprodukte und somit außerhalb des eingestellten Massenfensters liegen. Dies ist wichtig, da bei der hME-Methode die überschüssigen, in der PCR unverbrauchten Primer nicht entfernt werden.

Die PCR im Rahmen der hME-Methode wurde auf 384-er Mikrotiterplatten mit je 5 ng getrockneter DNA und 6 µl eines definierten Mastermixes (siehe Tabelle 4) unter

## Material und Methoden

Verwendung der in Tabelle 5 dargestellten „Sense“- und „Antisense“-Primer durchgeführt.

Komponenten	Volumen	Konzentration der Stammlösung
10x Puffer	0,6 ml	10x
dNTP-Mix	0,6 ml	(je 2 mM)
Sense-Primer	0,1 ml	100 mM
Antisense-Primer	0,1 ml	100 mM
HotStarTaq	0,02 ml	5 U/ml
MgCl <sub>2</sub>	0,24 ml	25 mM
H <sub>2</sub> O	ad 6 ml	

**Tabelle 4. Komponenten der PCR-Reaktion im Rahmen der hME-Methode.**

SNP	Sense-Primer	Antisense-Primer	hME-Primer (Extension)
TLR2-540 (rs4696480)	ACGTTGGATGGGGAA GTCCAAGATTGAAGG	ACGTTGGATGCTCAC CATGTGATGCTTCC	TGTAGCCAGATGACCCTC
TLR2-29886 (rs3804099)	ACGTTGGATGCTGCT TCATATGAAGGATCAG	ACGTTGGATGGATCT ACAGAGCTATGAGCC	CAGTTTGAAGTCAATTCAGAA
TLR2-1868 (rs1898830)	ACGTTGGATGCCTTA AAAAC TGGAAAAGGA	ACGTTGGATGCCCC TATTTCTAGCACATT	GCTTATATTATTATTTCCCTGTTC

**Tabelle 5. Primer für die PCR-Reaktion im Rahmen der hME-Methode.**

Die PCR erfolgte in einem Thermocycler unter den in Tabelle 6 dargestellten Reaktionsbedingungen.

Temperatur	Zeit
95° C	15 min (1 Zyklus)
95° C	20 sec
56° C	30 sec (45 Zyklen)
72° C	1 min
72° C	3 min (1 Zyklus)
4° C	unendlich

***Tabelle 6. Temperaturbedingungen der PCR-Reaktion im Rahmen der hME-Methode.***

Mittels Gel-Elektrophorese in 3% Agarosegel wurde das Amplifizierungsergebnis von je 24 Proben einer 384-er Platte unter Einschluss von Negativkontrollen überprüft.

### 2.9.6.5 SAP-Reaktion

Nach der PCR erfolgte die Elimination von freien, nicht in das Amplifikat einbezogenen Desoxynukleotiden durch das Enzym SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase). Dies dient der Vermeidung der Entstehung anderer Primer-Extensions-Produkte als der vorher bestimmten, was problematisch für eine korrekte Detektion des SNP wäre. Die Komponenten der SAP-Reaktion und die Reaktionsbedingungen für das Thermocycling zur Enzyminaktivierung sind in Tabelle 7 und Tabelle 8 beschrieben.

Komponenten	Volumen
H <sub>2</sub> O	881,3 µl
hME-Puffer	97,9 µl
SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase)	172,8 µl

**Tabelle 7. Komponenten der SAP-Reaktion.**

Temperatur	Zeit
37° C	20 min
85° C	10 sec
20° C	1 sec

**Tabelle 8. Temperaturbedingungen der SAP-Reaktion.**

#### 2.9.6.6 Primer-Extensions-Reaktion

Durch eine Primer-Verlängerung (Primer-Extension) entstehen SNP-spezifische Primer-Extensionsprodukte, die sich aufgrund ihres unterschiedlichen Gewichts massenspektrometrisch unterscheiden lassen.

Die Primer werden so gewählt, dass entweder das 3'- oder das 5'-Ende des Primers (je nachdem, ob es sich um einen „Sense“- oder „Antisense“-Primer handelt) eine Base vor dem SNP zu liegen kommt. Die Verwendung von Didesoxynukleosidtriphosphaten (ddNTPs) führt je nach Vorliegen des entsprechenden Allels zum Kettenabbruch und somit auch zu unterschiedlich großen Extensionsprodukten, die in der MALDI-TOF analysiert werden können.

2 µl eines nach dem in Tabelle 9 dargestellten Protokoll angefertigten Mastermixes wurden jeder Probe zugesetzt.



Komponenten	Volumen
Stopplösung (hME Extend Mix, enthaltend Puffer und dNTPs/ddNTP)	0,2 ml
hME-Primer	0,054 ml
MassExtend Enzym (Thermosequenase)	0,018 ml
H <sub>2</sub> O	Ad 2 ml

**Tabelle 9. Komponenten der PCR für die Primer-Extensions-Reaktion.**

Alle erforderlichen Pipettierschritte erfolgten dabei auf der Pipettierstation Multimek96 Automated 96 Channelpipettor unter Verwendung von programmierten Standardabläufen.

Das für die Primer-Extensionsreaktion erforderliche Thermocycling wurde nach dem in Tabelle 10 dargestellten Protokoll durchgeführt.

Temperatur	Zeit
94° C	2 min
94° C	5 sec
52° C	5 sec (insgesamt 55 Zyklen)
72° C	10 sec
20° C	1 sec

**Tabelle 10. Temperaturbedingungen der Primer-Extensions-Reaktion.**

### 2.9.6.7 Aufreinigung der Extensionsprodukte

Vor der massenspektrometrischen Analyse wurden die Extensionsprodukte mittels eines Kationenaustauschharzes (SpectroClean) aufgereinigt. Die Aufreinigung dient der Entfernung von beispielsweise letzten Pufferbestandteilen oder  $Mg^{2+}$ , die die anschließende Detektion negativ beeinflussen könnten.

Nach einem Standardprotokoll wurden zusätzlich zu SpectroClean noch 16 µl H<sub>2</sub>O pro Vertiefung in der Platte mit Hilfe eines Multimek-Pipettierroboters hinzugegeben. Abschließend erfolgten Zentrifugation und Rotation.

### 2.9.6.8 MALDI-TOF Massenspektrometrie im Rahmen der hME-Methode

Nach der beschriebenen Probenaufarbeitung wurden 1-2 nl des Analysengemisches mit Hilfe des Spectro Point Nanoliter-Pipettiersystems auf einen 384-er Siliziumchip übertragen, der mit einer kristallinen Matrix (3-Hydroxypicolinsäure) beladen war. Zur Kalibrierung des Analysesystems wurde auf 10 weiteren Matrixspots auf dem Chip ein Kalibrant aufgetragen. Der beladene Chip wurde auf einen metallischen Probenträger transferiert und in die Vakuumschleuse des Massenspektrometers eingeführt. Die Vermessung und Analyse der Proben und die Kalibrierung des Systems erfolgten automatisch nach Standardeinstellungen.

### 2.9.7 Messung von sCD14

Die Messung von sCD14 erfolgte im Institut für Klinische Immunologie und Labormedizin unter der Leitung von Herr Prof. Dr. Gregor Bein.

Es wurde der sCD14 Immunoassay der Firma Quantikine, ein Festphasen-ELISA, verwendet. Ein monoklonaler Antikörper, der spezifisch für sCD14 ist, befindet sich auf einer Mikroplatte. Die Standardproben und die sCD14-Proben werden in die Vertiefungen der Mikroplatte pipettiert. Das vorhandene lösliche CD14 bindet an die immobilisierten Antikörper. Anschliessend werden alle ungebundenen Substanzen aus dem Reagenz herausgewaschen und ein enzymgebundener Antikörper, der für sCD14 spezifisch ist, wird in die Vertiefungen gegeben. Es erfolgt ein erneuter Waschgang, um alle ungebundenen Substanzen herauszuwaschen. Eine Substratlösung wird in die Vertiefungen gegeben und die Farbe des Produktes ändert

sich proportional zu der Menge an löslichem CD14, das im ersten Schritt an die Antikörper gebunden hat.

Die Substratlösung ist eine Mischung aus Wasserstoffperoxid und stabilisiertem Tetramethylbenzidin. Die Farbumwandlung wird nach 30 Minuten Inkubationszeit durch Schwefelsäure gestoppt. Die Farbintensität wird im Spektralphotometer bestimmt. Der Immunoassay enthält acht Standardlösungen. Bei jeder durchgeführten Messung werden die Standardproben doppelt mitgeführt. Es wird der Durchschnittswert der doppelten Messung ermittelt. Hiervon wird der Durchschnittswert des Nullstandards abgezogen und eine Standardkurve errechnet. Alle sCD14-Serumproben wurden einfach gemessen (adaptiert aus Hasemann 2006).

### 2.9.8 Messung von Gesamt-IgE

Die Messung des Gesamt-IgE im Serum erfolgte in unserem Labor mit dem immunometrischen Chemilumineszenz Assay IMMULITE Total IgE von DPC Biermann. Hierbei wurden 5 µl Serum in eine Testküvette gegeben, die eine mit monoklonalen IgE-Antikörpern beschichtete Kugel enthält. Ein Reagenz, das mit Alkalischer Phosphatase markierte polyklonale IgE-Antikörper enthält, wurde hinzupipettiert.

Während einer dreißigminütigen Inkubation bei 37°C wird das IgE aus der Patientenprobe an die Kugel-Matrix gebunden. Der IgE-Antikörper aus dem Reagenz bindet gleichermaßen an das IgE-Molekül. Je mehr IgE sich in der Probe befindet, umso mehr dieser Immunkomplexe entstehen. Durch Waschschrte wird das ungebundene Material aus der Testküvette entfernt. Hiernach wird Chemilumineszenz-Substrat (Adamantylidioxetanphosphat) hinzugegeben. Durch die Alkalische Phosphatase wird das Substrat in ein instabiles Zwischenprodukt umgesetzt, das beim Zerfall ein Photon aussendet. Nach fünf Minuten wird das erzeugte Licht mit Hilfe eines Photoverstärkers gemessen. Die ausgesendete Lichtmenge ist direkt proportional zur Menge der gebundenen alkalischen Phosphatase und damit auch zur Menge an IgE in der Probe. Das Lumineszenzsignal wird in Counts per Second (CPS) gemessen.

Mit Hilfe einer Eichkurve wird die Messung in die korrespondierende Konzentration an IgE umgewandelt und ausgedruckt.

### 2.10 Statistik

#### 2.10.1 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Die Frequenz eines Genotyps wird zum Teil durch ein Vererbungsmuster bestimmt. Dabei geht man im Allgemeinen von einer zufälligen Paarung aus. Dominante und rezessive Merkmale befinden sich in einer Population in einem Gleichgewicht. Die Mathematiker G.H. Hardy und W. Weinberg zeigten, dass in einer „idealen Population“ die Allelhäufigkeiten und somit auch die Genotypfrequenzen über Generationen hinweg konstant bleiben.

Die Grundvoraussetzungen für diese „ideale Population“ sind Diploidie des Organismus, das Vorhandensein von zwei Allelen des betreffenden Gens, sexuelle Fortpflanzung, fehlende Überlappung der Generationen, Panmixie (zufällige und uneingeschränkte Paarung der Individuen), eine „unendliche“ Populationsgröße, Gleichheit der Allelfrequenz bei männlichen und weiblichen Individuen sowie das Fehlen von Mutationen, Selektion und Gendrift (Hartl and Clark 1997).

$p$  und  $q$  stellen die Allelfrequenzen von  $A$  und  $a$ ,  $p^2$ ,  $2pq$  und  $q^2$  die Häufigkeit der jeweiligen Genotypen dar ( $AA = p^2$ ,  $Aa = 2pq$ ,  $aa = q^2$ ). Die mathematische Beziehung der Allel- und Genotypfrequenzen wird durch folgende Formeln ausgedrückt:  $p^2 + 2pq + q^2 = 1$  und  $p + q = 1$ .

Ist das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht nicht erfüllt, so deutet dies auf eine Verletzung der Modellannahmen hin. In der Praxis lassen grobe Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht meist auf ein Problem bei der Genotypisierung schließen.

Als Test auf Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht wurde der Chi-Quadrat-Test (Chi<sup>2</sup>-Test) verwendet, bei dem die erwarteten Häufigkeiten aus den beobachteten Allelfrequenzen abgeleitet werden.

#### 2.10.2 Statistische Analysen für die Population der ISAAC Studie

Die statistischen Analysen für die Population der ISAAC Studie wurden mit der Statistik-Software SAS (version 8.2; SAS Institute GmbH, Heidelberg, Deutschland) und dem Statistikprogramm SPSS (version 10.0; SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) durchgeführt.

Zum Vergleich der verschiedenen Merkmale zwischen den Untergruppen wurden der Chi<sup>2</sup>-Test und der Cochran-Armitage-Trendtest verwendet. Die Werte für Gesamt-IgE

im Serum wurden mit geometrischen Mittelwerten und 95% Konfidenzintervallen, die sCD14-Spiegel im Serum mit dem Median deskriptiv zusammengefasst. Da die sCD14-Spiegel nicht normalverteilt, sondern zu niedrigeren Werten hin verzerrt waren, wurden sie für die statistischen Analysen log-transformiert und für die graphische Darstellung zurücktransformiert. Zum Vergleich der Genotypen CC und TT wurden Varianz- und Kontrastanalysen der log-transformierten Werte für IgE und sCD14 benutzt. Als Signifikanzniveau wurde ein  $\alpha$  von 0,05 für alle statistischen Tests festgelegt.

### 2.10.3 Statistische Analysen für die Population der PARSIFAL Studie

Die statistischen Analysen für die Population der PARSIFAL Studie wurden mit dem Programm Stata/SE 10.0 (Stata Corporation, College Station, Texas, USA) durchgeführt. Der Vergleich der Genotypfrequenzen zwischen den Bauernkindern und Kontrollkindern sowie die Prüfung auf Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE) erfolgten mittels Chi<sup>2</sup>-Test. Die Frequenzen der untersuchten Phänotypen wurden in Zusammenhang mit den Genotypen der TLR2-Polymorphismen gesetzt. Für das Minorallel homozygote Genotypen mit einer Frequenz von weniger als 10% wurden mit dem jeweiligen heterozygoten Genotyp zusammengefasst. Die Odds Ratios (ORs) für die Assoziation zwischen Genoytp und Phänotyp wurden mit Hilfe von logistischen Regressionsmodellen berechnet, bei denen Studienzentrum, Bauernstatus, Alter und Geschlecht als unabhängige Variablen eingeschlossen wurden. Andere Variablen wurden als potentielle Störfaktoren bei einer Assoziation mit dem Polymorphismus mit einem p-Wert von < 0,2 in ein logistisches Regressionsmodell eingeschlossen. Als potentielle Störvariablen wurden die Anzahl der älteren Geschwister, Passivrauchen, Rauchen während der Schwangerschaft, Stillen, stattgehabte Parasiteninfektionen, Art der Landwirtschaft, Hilfe bei der Heuernte in der letzten Saison, Häufigkeit des Stallaufenthalts in den letzten Monaten, Stalltierkontakt im ersten Lebensjahr, Rohmilchgenuss im ersten Lebensjahr und aktueller Rohmilchkonsum angesehen. Als Test für Gen-Umwelt-Interaktionen wurden Likelihood-Ratio-Tests durchgeführt, bei denen Modelle, die das Interaktionsmerkmal einschlossen mit Modellen ohne das Interaktionsmerkmal getestet wurden. Die Modelle wurden auf Homogenität zwischen den Studienzentren geprüft. Als signifikant wurden zweiseitige p-Werte von 0,05 gewertet.

### 3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit soll die Bedeutung von Polymorphismen im CD14-TLR2-System für die Entstehung atopischer Erkrankungen untersucht werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit vervollständigen die Datenlage zur Assoziation genetischer Variationen im CD14-TLR2-System mit atopischen Phänotypen in Subpopulationen aus den Studien ISAAC und PARSIFAL. Die bisherigen Studien zeigen widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich des Effekts des CD14 C-159T Polymorphismus auf die Entstehung atopischer Phänotypen. Nie zuvor wurde die Assoziation dieses SNP mit IgE und sCD14 bei einer so großen Population wie der Studienpopulation der ISAAC Studie und in verschiedenen Altersgruppen untersucht. Ergänzend zu unseren Daten liegen für die Population der ISAAC Studie Daten zur Assoziation von TLR2 mit Atopie vor. Dabei zeigte sich eine schwache Assoziation eines TLR2-Polymorphismus (dem TLR2-29886 Polymorphismus) mit nichtatopischem Asthma, während ein starker protektiver Effekt von Polymorphismen in den Genen anderer mit TLR2 assoziierter Rezeptoren aus der Familie der Toll-like-Rezeptoren vor atopischem Asthma beobachtet werden konnte (Kormann et al. 2008).

Da das CD14-TLR2-System eine entscheidende Rolle bei der Erkennung von Bakterienbestandteilen spielt, sind genetische Varianten in diesem Rezeptorsystem von besonderem Interesse für Analysen im Rahmen der Bauernstudien. Zum Zusammenhang von Polymorphismen im TLR2-Gen mit atopischen Erkrankungen existieren bisher bereits Resultate aus der Bauernstudie ALEX (Eder et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit soll an der Population einer zweiten Bauernstudie, der PARSIFAL Studie, der Versuch der Replikation der Ergebnisse für genetische Varianten im TLR2-Gen unternommen werden. Ergänzend hierzu liegen zur Assoziation des CD14 C-159T Polymorphismus in einer Subpopulation der PARSIFAL Studie bereits Daten aus einer anderen Untersuchung vor. Dabei konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen diesem SNP und Asthma und Allergien nachgewiesen werden (Bieli et al. 2007).

Tabelle 11 zeigt, wie durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Resultate aus anderen Untersuchungen ergänzt werden und damit die Datenlage zum CD14-TLR2-System für die Studien ISAAC und PARSIFAL vervollständigt wird.

## Ergebnisse

	CD14	TLR2
ISAAC- Studie	X	Kormann et al. 2008
PARSIFAL Studie	Bieli et al. 2007	X

**Tabelle 11. Datenlage zum CD14-TLR2-System.** Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit (mit X bezeichnet) ergänzen die Resultate aus anderen Untersuchungen zum CD14-TLR2-System in den Studien ISAAC und PARSIFAL.

### 3.1 Charakteristika der Kinder aus der ISAAC Studie

Tabelle 12 zeigt die demographischen Charakteristika der Studienpopulation aus der ISAAC Studie. Die Kinder, für die Genotypisierungen für den CD14 C-159T Polymorphismus durchgeführt wurden, unterschieden sich nicht signifikant von den nicht genotypisierten Kindern. Es wurden nur Kinder deutscher Abstammung untersucht. Während die Prävalenz von Atopie bei den Münchner Erstklässlern mit 11,3% niedriger als bei den Viertklässlern lag, konnte kein signifikanter Unterschied in der Prävalenz von Atopie zwischen den Münchner Viertklässlern und Dresdner Viertklässlern beobachtet werden. Die geometrischen Mittelwerte der log-transformierten Werte des Gesamt-IgE im Serum und die Frequenz des T-Allels des untersuchten Polymorphismus im CD14-Gen sind zusätzlich in Tabelle 12 dargestellt.

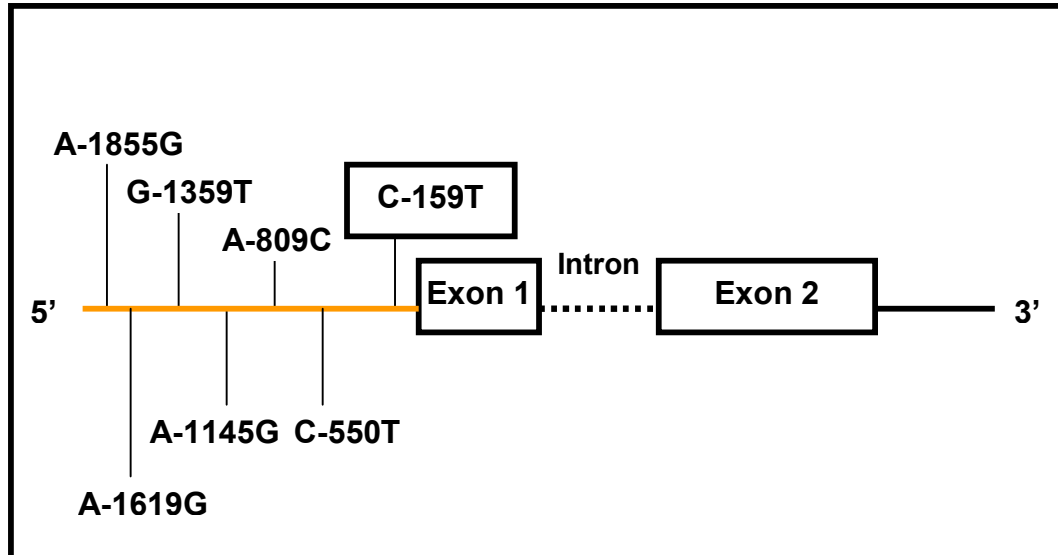
## Ergebnisse

	München Erstklässler (n=256)	München Viertklässler (n=1087)	Dresden Viertklässler (n=705)
<b>Männliches Geschlecht (%)</b>	50,8	48,4	51,5
<b>Mittleres Alter in Jahren (Standardabweichung)</b>	5,9 (0,4)	9,5 (0,5)	9,7 (0,6)
<b>Atopie (SPT positiv, %)</b>	11,3	24,6	26,2
<b>Geometrischer Mittelwert Serum-IgE (log-transformiert IU/ml)</b>	39,4	64,8	57,6
<b>Frequenz T-Allel (CD14 C-159T SNP)</b>	0,49	0,47	0,47

**Tabelle 12. Deskriptive Charakteristika der Studienpopulation aus der ISAAC Studie.**  
Abkürzungen: SPT: „Skin Prick Test“, Hautpricktest. IgE: Immunglobulin E.



### 3.2 Genotypisierung für den C-159T Polymorphismus im CD14-Gen bei den Kindern aus der ISAAC Studie und Erwachsenen aus Gießen



**Abbildung 5. Schematische Struktur des CD14-Gens mit den Polymorphismen der Promoterregion (Frequenz > 10%).** (adaptiert aus LeVan et al. 2005).

Von den bisher bekannten Polymorphismen im CD14-Gen haben nur neun eine Allelfrequenz von mehr als 10%. Von diesen Polymorphismen liegen sieben in der Promoterregion des CD14-Gens (LeVan et al. 2005). In Abbildung 5 sind diese Promoterpolymorphismen schematisch dargestellt. Der C-159T Polymorphismus scheint eine funktionelle Bedeutung im Sinne einer Regulierung der CD14-Transkription in Monozyten zu haben. In zahlreichen Studien wurden unter anderem bisher die Bedeutung dieses Polymorphismus bei atopischen Erkrankungen und sein Einfluss auf die Serumspiegel von IgE und sCD14 untersucht.

Deshalb wählten wir den C-159T Polymorphismus auch für unsere Analysen aus und führten Genotypisierungen mittels Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus-Analyse (RFLP) hierfür durch. Insgesamt waren die Genotypisierungen für den CD14 C-159T Polymorphismus erfolgreich bei 2971 Proben. Das entspricht 99,7% aller Proben, bei denen DNA zur Verfügung stand.

Die Frequenzen der Genotypen CC (homozygot Wildtyp), CT (heterozygot) und TT (homozygot Polymorphismus) bzw. die Frequenzen für die Allele C und T der Münchner und Dresdner Kinder sind in Tabelle 13 aufgeführt. Es wurden keine signifikanten Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht beobachtet.

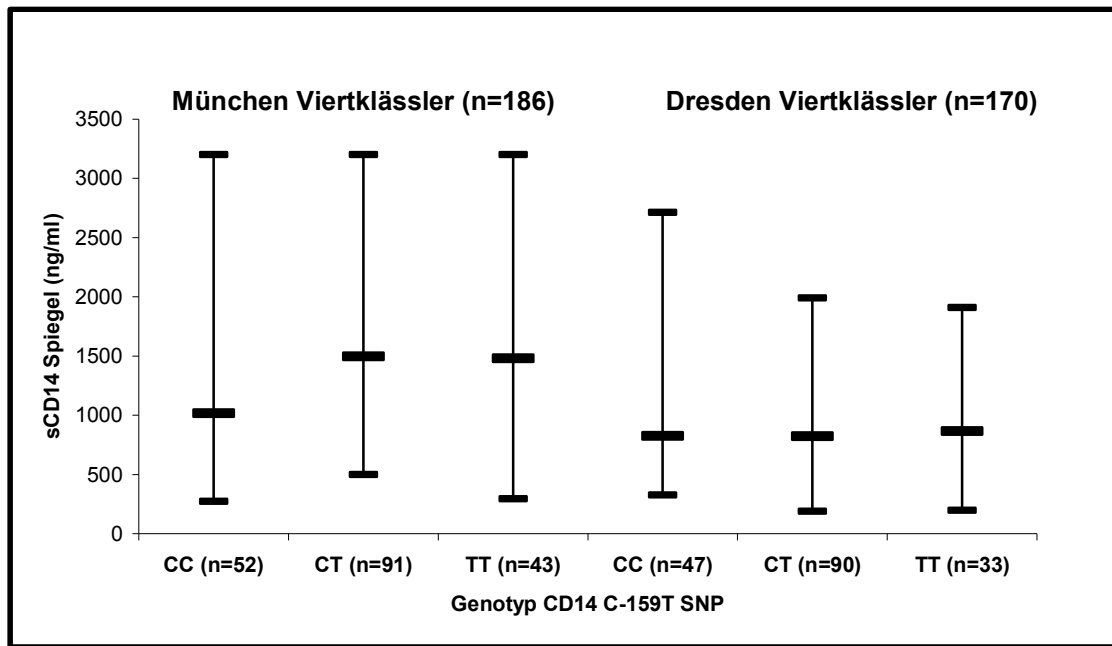
## Ergebnisse

	Münchner Kinder (n=1343)	Dresdner Kinder (n=705)
<b>Genotyp CC</b>	0,28	0,26
<b>Genotyp CT</b>	0,50	0,53
<b>Genotyp TT</b>	0,23	0,21
<b>Allel C</b>	0,52	0,53
<b>Allel T</b>	0,48	0,47
<b>p-Wert der Abweichung vom HWE</b>	0,9196	0,7544

***Tabelle 13: Frequenzen der Genotypen bzw. der Allele des CD14 C-159T Polymorphismus in der Studienpopulation. HWE: Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.***

### 3.3 Assoziation des CD14 C-159T Polymorphismus mit sCD14, IgE und atopischen Phänotypen

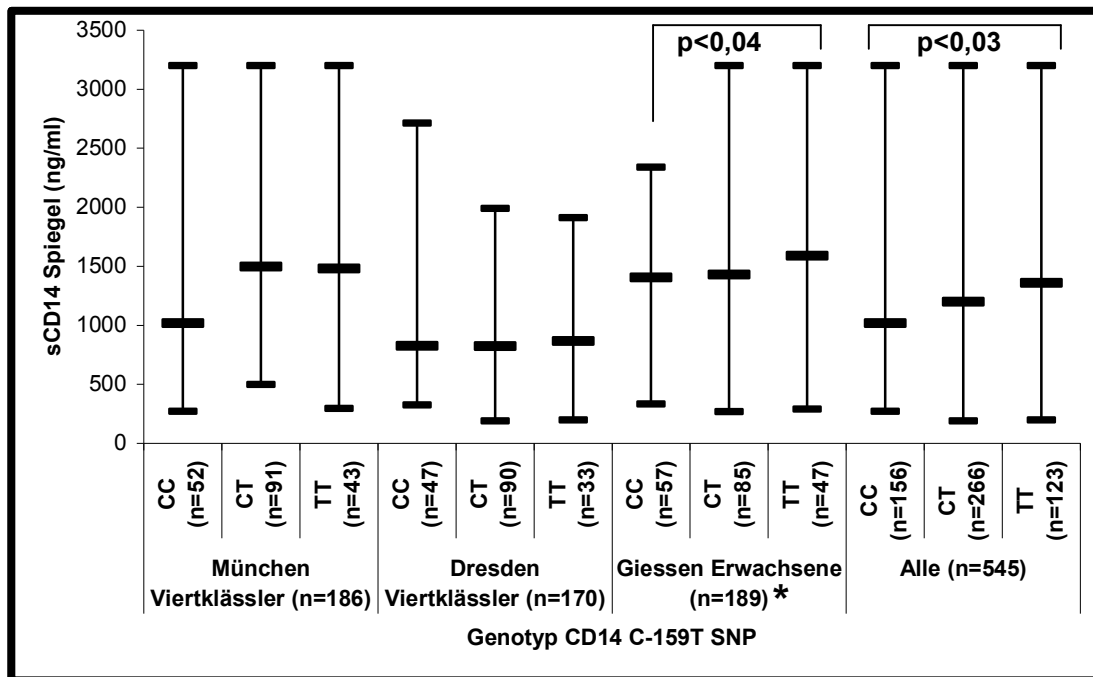
Die Assoziation zwischen dem Genotyp des CD14 C-159T Polymorphismus und dem Serumspiegel von sCD14 wurde bei zwei Untergruppen der Studienpopulation untersucht (Münchner Viertklässler, n=186 und Dresdner Viertklässler, n=170). Hierbei zeigte sich ein Trend für erhöhte sCD14-Spiegel bei Trägern des Genotyps TT. Bei den Kollektiven aus der ISAAC Studie erreichte dieser Trend keine statistische Signifikanz (Abbildung 6).



**Abbildung 6. Mediane der Serumspiegel von sCD14 in ng/ml.**

Die Mediane der Serumspiegel von sCD14 sind aufgetragen nach CD14 C-159T Genotyp bei Münchner und Dresdner Kindern.

In Zusammenarbeit mit dem Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der Universität Gießen unter der Leitung von Prof. Dr. Bein wurden unsere beiden Kollektive mit einem Kollektiv von 189 gesunden, erwachsenen Probanden aus Gießen zusammengefügt. Dieses Gießener Kollektiv wurde im Labor Gießen für den CD14 C-159T Polymorphismus genotypisiert und sCD14 und IgE wurden bestimmt. Im Gießener Kollektiv erreichte die Assoziation zwischen dem Genotyp des CD14-SNP und sCD14 statistische Signifikanz beim Vergleich der Genotypen CC und TT. Bei dem Gesamtkollektiv stellten wir ebenso eine statistisch signifikante ( $p < 0,03$ ) Erhöhung des sCD14-Spiegels beim Genotyp TT (1370 ng/ml) gegenüber dem Genotyp CC (1017 ng/ml) fest. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 7 dargestellt.

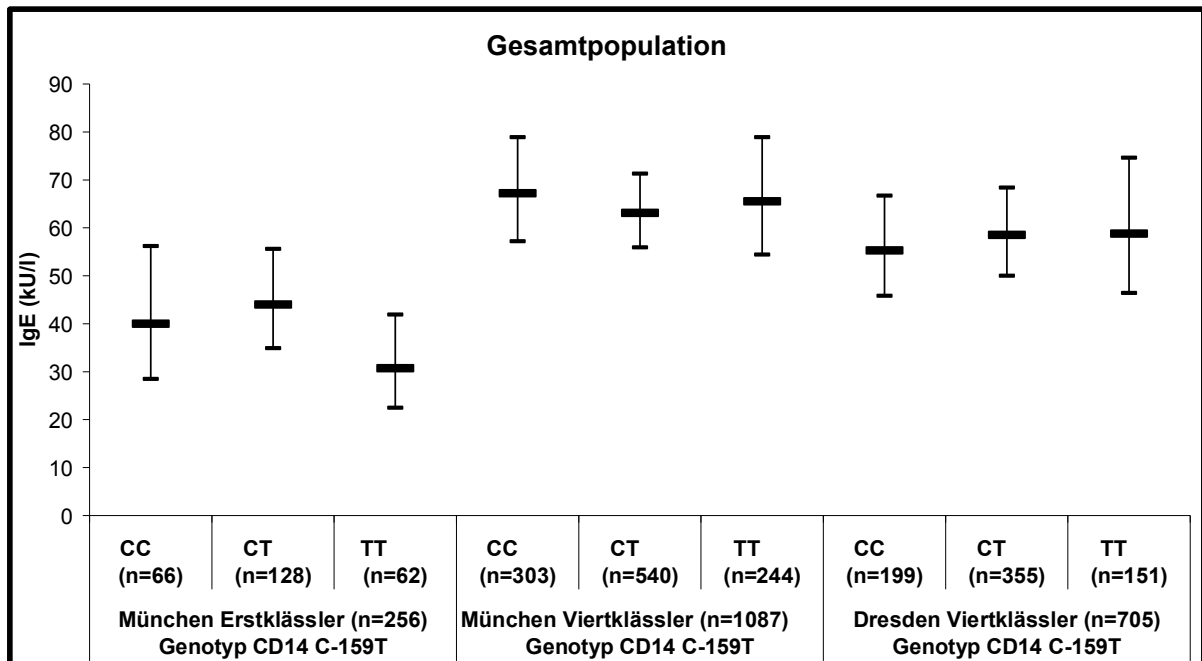


**Abbildung 7. Mediane der Serumspiegel von sCD14 in ng/ml, aufgetragen nach CD14 C-159T Genotyp bei Münchner und Dresdner Viertklässlern, Gießener Erwachsenen und dem Gesamtkollektiv.**

\* : Daten freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Prof. Dr. Bein, Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der Universität Gießen.

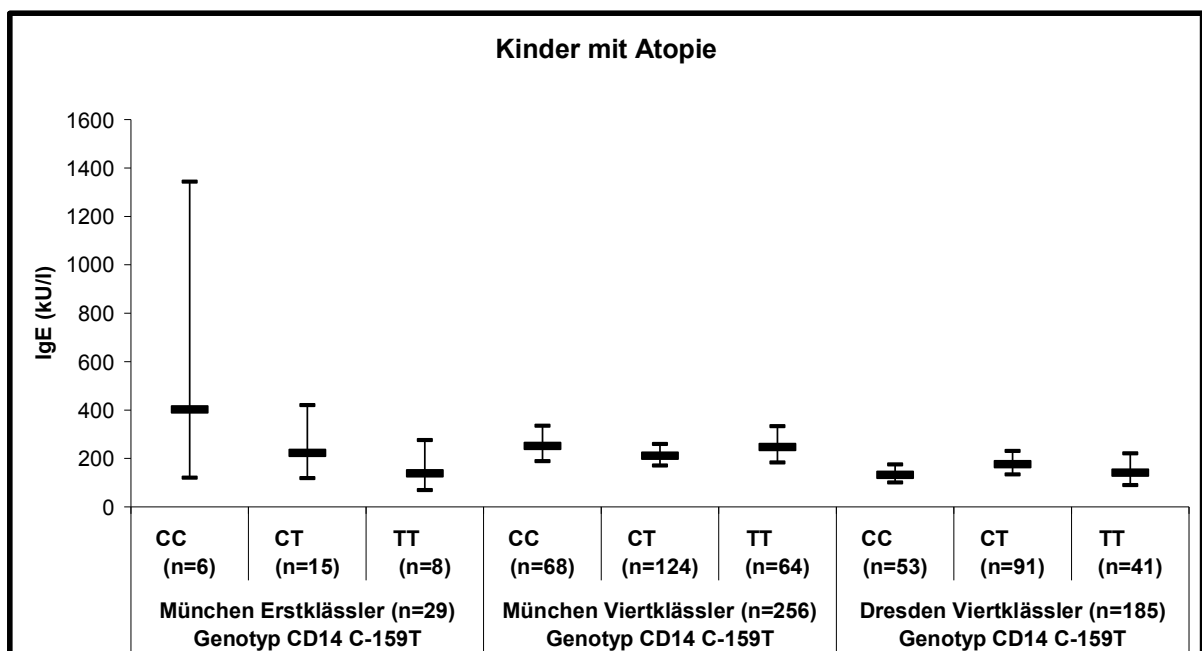
Wir untersuchten die geometrischen Mittelwerte der log-transformierten IgE-Werte auf eine Assoziation mit den Genotypen des C-159T Polymorphismus. Wir konnten keine signifikanten Unterschiede bei den IgE-Spiegeln der Münchner und Dresdner Kinder feststellen (Abbildung 8). Auch im Vergleich mit dem Kollektiv der gesunden Gießener Erwachsenen war kein signifikanter Unterschied bei den IgE-Werten zu beobachten.

Die Population der Kinder aus der ISAAC Studie wurde nach dem Vorliegen von Atopie stratifiziert. Bei der Analyse der atopischen Subpopulation stellten wir ebenso keine signifikante Assoziation zwischen den IgE-Spiegeln und den Genotypen fest (Abbildung 9).



**Abbildung 8. Geometrische Mittelwerte der log-transformierten IgE-Werte bei der Gesamtpopulation.**

Die IgE-Werte sind aufgetragen nach CD14 C-159T Genotyp bei Kindern der ISAAC Studie nach Alter und Stadt.



**Abbildung 9. Geometrische Mittelwerte der log-transformierten IgE-Werte bei Kindern mit Atopie.**

Die IgE-Werte sind aufgetragen nach CD14 C-159T Genotyp bei Kindern der ISAAC Studie mit Atopie (definiert als mindestens ein positiver Hautpricktest) nach Alter und Stadt.

## Ergebnisse

Die Anzahl positiver Hautpricktests gegen häufige inhalative Allergene war zudem nicht assoziiert mit den CD14 C-159T Genotypen. Weiterhin gab es keine Korrelation erhöhter sCD14-Werte mit erniedrigten IgE-Werten.

Tabelle 14 zeigt die Prävalenzen von Asthma, Heuschnupfen und atopischer Dermatitis der untersuchten Populationen nach Alter und Stadt. Die Prävalenz der atopischen Phänotypen war bei keiner Gruppe mit den CD14 C-159T Genotypen assoziiert.

	München Erstklässler (n=256)			München Viertklässler (n=1087)			Dresden Viertklässler (n=705)			Gießen Erwachsene (n=160)		
	CC	CT	TT	CC	CT	TT	CC	CT	TT	CC	CT	TT
<b>Asthma</b>	7,7	12,2	8,2	11,2	12,3	11,1	7,0	10,7	8,0	5,4	5,4	7,1
<b>Heuschnupfen</b>	1,6	4,8	1,7	9,1	8,3	7,0	8,7	9,7	8,7	19,4	23,9	29,8
<b>Atopische Dermatitis</b>	15,6	11,9	13,6	16,6	20,5	18,3	20,2	16,2	19,6	4,2	10,0	7,3

**Tabelle 14. Prävalenzen atopischer Erkrankungen in der ISAAC Studienpopulation und der Population Erwachsener aus Gießen.**

Die Prävalenzen sind in Prozent angegeben und nach CD 14 C-159T Genotyp sowie nach Alter und Stadt aufgetragen.

### 3.4 Charakteristika der Kinder aus der PARSIFAL Studie

In den zweiten Teil der Analysen schlossen wir Kinder aus der multizentrischen Bauern-Querschnittsstudie PARSIFAL ein. Die deskriptiven Charakteristika der untersuchten Subpopulation sind in Tabelle 15 dargestellt.

	%	n
<b>Population nach Studienzentrum:</b>		
Deutschland	38,5	593
Österreich	19,1	294
Schweiz	14,9	229
Niederlande	13,2	203
Schweden	14,3	220
<b>Studiengruppe:</b>		
Bauernkinder	64,5	992
Kontrollkinder aus ländlichen Regionen	35,5	547
<b>Männliches Geschlecht</b>		
	52,2	803
<b>Alter in Jahren:</b>		
5-6	8,5	130
7-8	26,6	410
9	17,4	267
10-11	34,6	532
12-13	13,0	200
<b>Erkrankung mindestens eines Elternteils an...</b>		
...Asthma	11,1	163
...Heuschnupfen	20,5	304
...atopischem Ekzem	18,3	270

**Tabelle 15. Deskriptive Charakteristika der Studienpopulation aus der PARSIFAL Studie.**

In der untersuchten Population litten die Bauernkinder signifikant weniger häufig an Asthma, Giemen und Heuschnupfensymptomen als die Kontrollkinder aus denselben ländlichen Regionen.

## Ergebnisse

Der Gesamt-IgE-Spiegel im Serum lag bei den Bauernkindern für alle inhalativen Allergene außer der Katze und für den Nahrungsmittelmix signifikant niedriger. In Tabelle 16 sind die Frequenzen der Phänotypen für Bauernkinder und die Kontrollkinder aufgeführt.

<b>Phänotyp</b>	<b>Bauernkinder (%) (n=992)</b>	<b>Kontrollkinder aus ländlichen Regionen (%) (n=547)</b>	<b>p-Wert Chi<sup>2</sup> Test</b>
<b>Asthma</b>	6,6	11,7	0,001
<b>aktuell Giemen</b>	5,7	9,7	0,003
<b>aktuell Heuschnupfensymptome</b>	4,1	9,5	< 0,0005
<b>aktuell Ekzem</b>	9,6	9,7	0,920
<b>Spezifisches Serum IgE &gt; 3,5 kU/l für...</b>			
<b>...eines der Aeroallergene</b>	10,1	22,9	< 0,0005
<b>...Hausstaubmilbe</b>	6,0	13,2	< 0,0005
<b>...Gräserpollen</b>	4,8	12,6	< 0,0005
<b>...Baumpollen</b>	2,2	4,9	0,004
<b>...Katze</b>	1,0	1,8	0,175
<b>...Vorratsmilben</b>	2,7	0,7	0,007
<b>...Pferdeepithelien</b>	0,3	1,3	0,040
<b>...Nahrungsmittelmix (FX5)</b>	1,8	0,5	0,011
<b>Spezifisches Serum-IgE ≥0,7 kU/l gegen Nahrungsmittelmix (FX5)</b>	4,9	8,4	0,007

**Tabelle 16. Frequenzen der Phänotypen bei Bauernkindern und Kontrollkindern aus ländlichen Regionen im Rahmen der PARSIFAL Studie.**



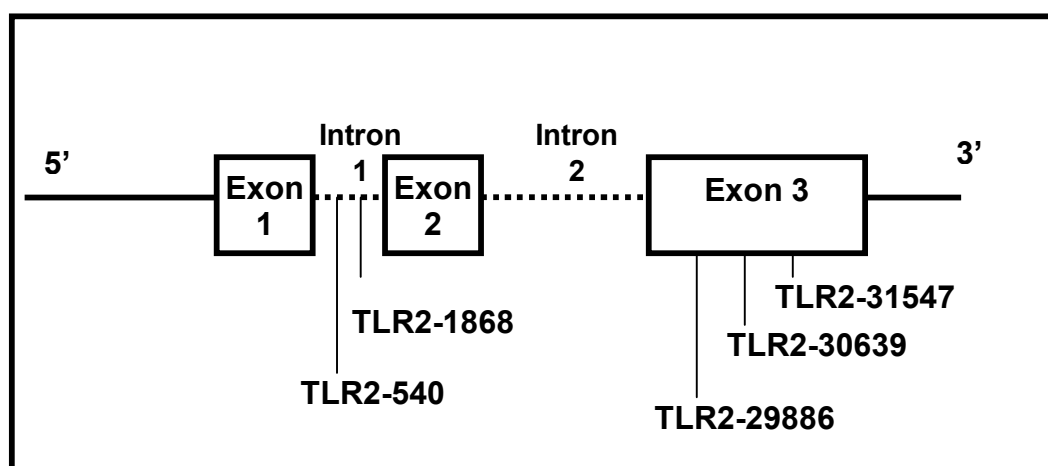
### 3.5 Genotypisierung für Polymorphismen im TLR2 Gen bei Kindern aus der PARSIFAL Studie

In den letzten Jahren wurden die genetischen Variationen in den Genen der Toll-like-Rezeptoren katalogisiert. Die Toll-like-Rezeptoren sind Kandidatengene für die Erforschung atopischer Erkrankungen. Um zu untersuchen, welche genetischen Polymorphismen mit bestimmten Phänotypen assoziiert sind, trifft man eine Auswahl unter der Anzahl der bekannten SNP. Dafür wählt man zum einen Polymorphismen aus, bei denen die Frequenz des Minor-Allels über 10% liegt. Die untersuchten SNP sollten in Genabschnitten mit Kopplungs-Ungleichgewicht („Linkage disequilibrium“, LD) liegen und den Hauptinformationsgehalt der häufig vorkommenden Haplotypen beschreiben. Dabei versteht man unter Haplotyp eine Kombination von Allelen an eng benachbarten Genloci auf einem Chromosom. Die Polymorphismen, die diese Voraussetzung erfüllen, nennt man „haplotype-tagging SNP“. In einer früheren Untersuchung in der Population der Bauernstudie ALEX wurden verschiedene solche Polymorphismen im TLR2-Gen untersucht. Dabei wurde eine starke Assoziation des TLR2-540 Polymorphismus mit Asthma und Allergien bei Bauernkindern beobachtet. Im gleichen Kollektiv konnte keine Assoziation zwischen den TLR2-Polymorphismen TLR2-29886 oder TLR2-30639 und atopischen Phänotypen bei Bauern und Kontrollkindern festgestellt werden (Eder et al. 2004). Es gibt Hinweise darauf, dass der TLR2-31547 SNP bei an atopischem Ekzem erkrankten Patienten mit einer schweren klinischen Ausprägung von assoziiert ist (Ahmad-Nejad et al. 2004). In einer deutschen Population von 275 Familien zeigte sich allerdings keine Verbindung zwischen den TLR2-Polymorphismen und Asthma, Rhinitis, atopischem Ekzem oder allergischer Sensibilisierung (Weidinger et al. 2006).

Tabelle 17 und Abbildung 10 sollen die „haplotype-tagging“ Polymorphismen und die nach bisherigen Erkenntnissen mit atopischen Erkrankungen in Verbindung gebrachten SNPs im TLR2-Gen veranschaulichen.

SNP	Relative Position / Allele des SNP	Identifikation nach NCBI reference sequence (rs)
TLR2-540	A-16934T	rs4696480
TLR2-29886	C+596T	rs3804099
TLR2-30639	T+1349C	rs3804100
TLR2-1868	A-15607G	rs1898830
TLR2-31547	A+2257G	rs5743708

**Tabelle 17. Haplotype-tagging SNPs sowie die nach bisherigen Erkenntnissen mit atopischen Erkrankungen assoziierten SNPs im TLR2-Gen.**



**Abbildung 10. Schematische Struktur des TLR2-Gens auf Chromosom 4q31.1-q35.** Eingezeichnet sind die Haplotype-tagging SNPs sowie die nach bisherigen Erkenntnissen mit atopischen Erkrankungen assoziierten SNPs (adaptiert aus Riva and Kohane 2002; <http://snpper.chip.org>; <http://innateimmunity.net>).

Für unsere Analysen erfolgten Genotypisierungen für die Polymorphismen TLR2-540, TLR2-1868 und TLR2-29886. Tabelle 18 stellt die jeweiligen Erfolgsraten für die Genotypisierung, die Frequenz des Minor-Allels und den p-Wert der Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE) dar. Es zeigten sich hierbei keine signifikanten Abweichungen vom erwarteten HWE.

## Ergebnisse

SNP	Erfolgsrate Genotypisierung (%)	Frequenz Minor-Allel	p-Wert der Abweichung vom HWE
TLR2-540	98,18	0,49	0,1156
TLR2-1868	92,43	0,34	0,4458
TLR2-29886	98,31	0,44	0,2584

**Tabelle 18. Genotypisierung der Single Nucleotide Polymorphismen im TLR2-Gen.**  
HWE: Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

In der Population der PARSIFAL Studie waren die Genotypisierungen bei 904 Bauernkindern und 504 Kontrollkindern aus denselben ländlichen Gebieten erfolgreich. Es traten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Genotypfrequenzen zwischen Bauernkindern und Kontrollkindern auf (Tabelle 19).

Bauernkinder (n=904)				Kontrollkinder (n=504)			
SNP	Wildtyp homozygot (%)	hetero- zygot (%)	Minor Allel homozygot (%)	Wildtyp homozygot (%)	hetero- zygot (%)	Minor Allel homozygot (%)	p- Wert
TLR2-540	25,3	50,1	24,6	27,6	46,8	25,6	0,477
TLR2-1868	42,8	46,9	10,2	45,0	44,2	10,7	0,628
TLR2-29886	33,2	49,4	17,4	31,2	48,1	20,7	0,310

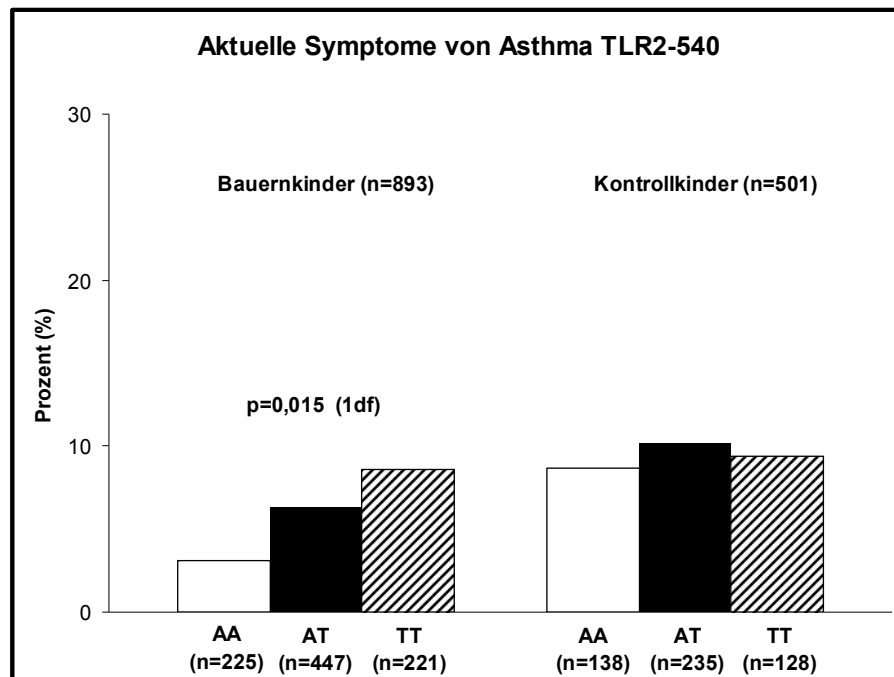
**Tabelle 19. Frequenzen der Genotypen der TLR2-Polymorphismen bei Bauernkindern und Kontrollkindern in der PARSIFAL Studie.**

Es sind die p-Werte für den  $\chi^2$ -Test für die Unabhängigkeit der Genotypfrequenzen zwischen Bauernkindern und Kontrollkindern angegeben.

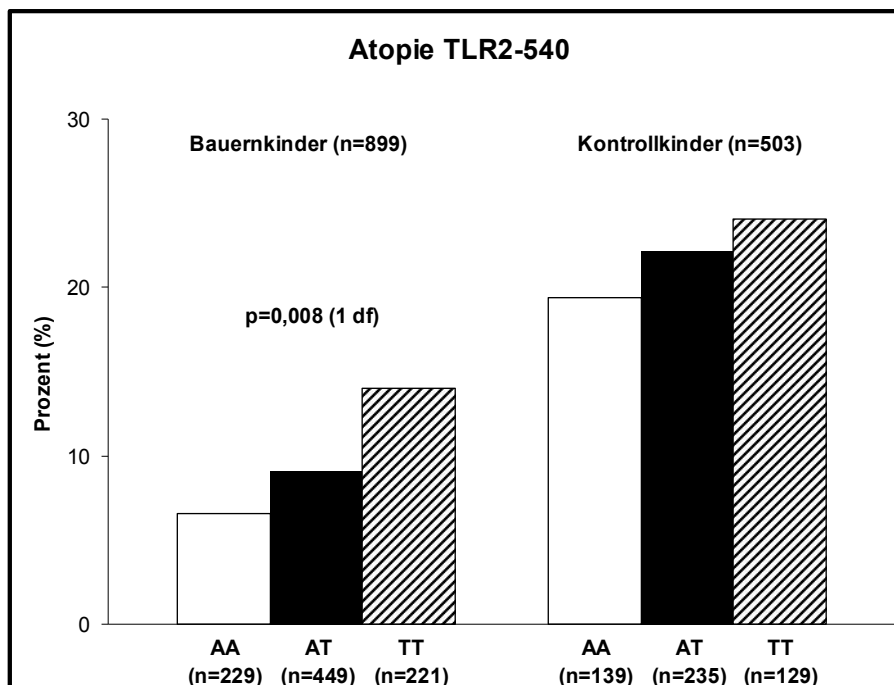
### 3.6 Assoziation des TLR2-540 Polymorphismus mit atopischen Phänotypen

Aus der ALEX Studie existieren Hinweise darauf, dass der TLR2-540 Polymorphismus eine wesentliche bestimmende Rolle bei der Entstehung von atopischen Erkrankungen bei Bauernkindern einnimmt (Eder et al. 2004). In unserer Analyse der Population der PARSIFAL Studie konnten wir erneut signifikante Assoziationen zwischen aktuellen Symptomen von Asthma und Atopie (definiert als erhöhter spezifischer IgE-Spiegel von mindestens 3,5 kU/l gegen mindestens ein Aeroallergen) feststellen (Abbildung 11 und 12). Diese Assoziation besteht auch in unserer Analyse nur bei den Bauernkindern und nicht bei den Kontrollkindern aus denselben ländlichen Regionen. Für die Diagnose Asthma und aktuelle Symptome von Heuschnupfen blieb diese Assoziation ohne Signifikanz (Abbildungen 13 und 14).

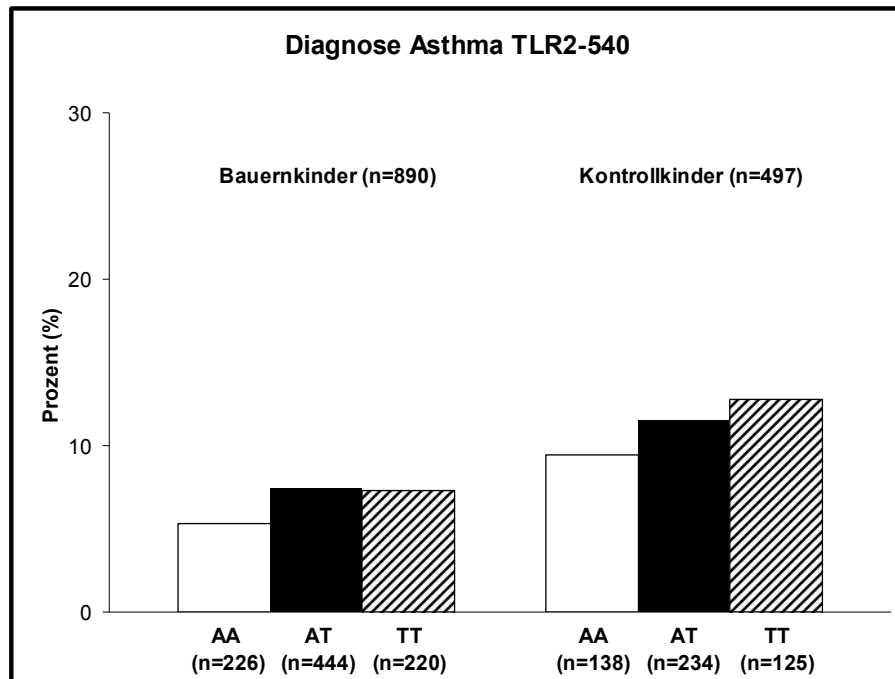
Nach Einschluss potentieller Störvariablen als unabhängige Variablen in logistischen Regressionsanalysen (z.B. Alter, Geschlecht, Studienzentrum, Passivrauchen, Nikotinkonsum während der Schwangerschaft und Kontakt zu Stalltieren im ersten Lebensjahr) blieb die positive Assoziation zwischen dem T-Allel des TLR2-540 SNP und den untersuchten Phänotypen signifikant für aktuelle Asthmasymptome und Atopie und nicht signifikant für die Diagnose Asthma und aktuelle Heuschnupfensymptome.



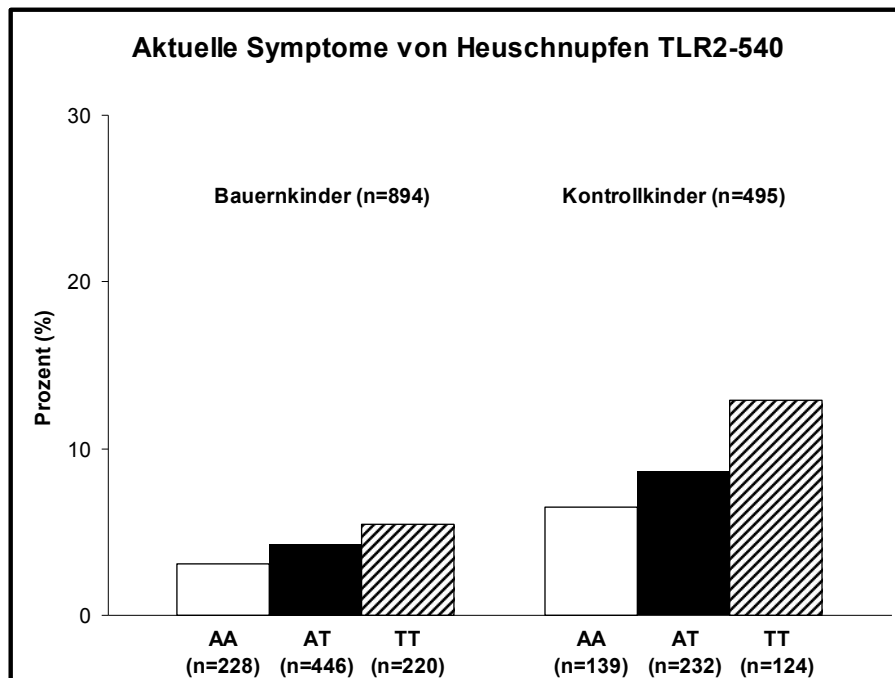
**Abbildung 11.** Frequenz des Phänotyps “Aktuelle Symptome von Asthma” nach Genotyp für den TLR2-540 SNP bei Bauernkindern und Kontrollkindern aus denselben ländlichen Regionen aus der Population der PARSIFAL Studie.



**Abbildung 12.** Frequenz des Phänotyps “Atopie” nach Genotyp für den TLR2-540 SNP bei Bauernkindern und Kontrollkindern aus denselben ländlichen Regionen aus der Population der PARSIFAL Studie.



**Abbildung 13.** Frequenz des Phänotyps „Diagnose Asthma“ nach Genotyp für den TLR2-540 SNP bei Bauernkindern und Kontrollkindern aus denselben ländlichen Regionen aus der Population der PARSIFAL Studie.



**Abbildung 14.** Frequenz des Phänotyps „Aktuelle Symptome von Heuschnupfen“ nach Genotyp für den TLR2-540 SNP bei Bauernkindern und Kontrollkindern aus denselben ländlichen Regionen aus der Population der PARSIFAL Studie.

Die Signifikanz der positiven Assoziation des T-Allels des TLR2-540 Polymorphismus mit den untersuchten Phänotypen blieb nach Einschluss potentieller Störvariablen in ein logistisches Regressionsmodell erhalten für die Phänotypen "Aktuelle Symptome von Asthma" und "Atopie". Dabei blieb die Assoziation zwischen dem T-Allel des TLR2-540 SNP nicht signifikant für die Phänotypen „Diagnose Asthma“ und „Aktuelle Symptome von Heuschnupfen“.

### **3.7 Assoziation der TLR2-1868 und TLR2-29886 Polymorphismen mit atopischen Erkrankungen**

Entsprechend der bisherigen Datenlage aus der ALEX Studie (Eder et al. 2004) konnten auch wir keine klaren Assoziationen zwischen atopischen Phänotypen und den Polymorphismen TLR2-1868 und TLR2-29886 zeigen.

### 4. Diskussion

Das CD14-TLR2-System scheint durch seine Schlüsselrolle in der LPS-vermittelten Signaltransduktion an einer Schnittstelle zwischen Genetik und Umwelteinflüssen zu stehen. In mehreren Untersuchungen wurde bisher über eine Assoziation von Single Nucleotide Polymorphismen in den Genen des CD14-TLR2-Systems mit der Entstehung von Asthma und Allergien berichtet. Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Untersuchungsergebnisse zu Polymorphismen im CD14-TLR2-System sollen vor dem Hintergrund der bisherigen Studienlage diskutiert werden.

Bei der für diese Arbeit untersuchten Population von Kindern aus der ISAAC Studie zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem CD14 C-159T Polymorphismus und dem Gesamt-IgE-Spiegel im Serum oder mit Atopie im Sinne der Anzahl positiver Hautpricktest-Ergebnisse. Wir stellten keine Korrelation zwischen dem SNP und atopieassoziierten Phänotypen fest. Weiterhin beobachteten wir einen nicht signifikanten Trend zu einer positiven Assoziation zwischen dem Genotyp TT des Polymorphismus und den sCD14-Spiegeln im Serum bei den Subpopulationen der Kinder aus der ISAAC Studie. Dieser Trend erreichte erst Signifikanzniveau nach Zusammenfügen der Kollektive aus der ISAAC Studie mit einem Kollektiv erwachsener Probanden aus Gießen.

Unsere Resultate bestätigen die gesteigerte Promoteraktivität durch das T-Allel des CD14 C-159T SNP, da Träger des T-Allels höhere sCD14-Spiegel zeigten.

Im Einklang dazu steht ein Bericht über eine erhöhte mCD14-Expression auf Monozyten bei Trägern des T-Allels (Hubacek et al. 1999) und die Ergebnisse, die auf eine funktionelle Bedeutung des CD14 C-159T Polymorphismus mit erhöhten Transkriptionsraten bei Trägern des T-Allels hindeuten (LeVan et al. 2001).

Die Datenlage von Assoziationsstudien zum Zusammenhang des CD14 C-159T Polymorphismus mit atopischen Phänotypen, IgE und sCD14 ist kontrovers. Ein Grund hierfür könnte sein, dass einige der Studien nicht über die notwendige Populationsgröße und statistische Teststärke verfügten (Lohmueller et al. 2003).

Unsere Studienpopulation aus der ISAAC Studie ist die bisher größte Population, für die Daten zum Genotyp für den CD14 C-159T Polymorphismus sowie Daten zum



Atopiestatus, IgE und sCD14 im Serum vorliegen. Durch die Populationsgröße ist es sehr wahrscheinlich, dass ein vorhandener Effekt auch erkannt wird.

In allen drei von uns untersuchten Populationen zeigte sich ein Trend für erhöhte sCD14-Werte bei Trägern des T-Allels, wobei dieser Trend nur in der Erwachsenenpopulation statistische Signifikanz erreichte. Die Tatsache, dass wir einen Effekt des CD14 C-159T SNP auf sCD14, nicht aber auf IgE zeigen konnten, lässt den Schluss zu, dass eine Modifikation der sCD14-Expression alleine noch keine wesentliche Auswirkung auf IgE zu haben scheint. Wahrscheinlich reicht es jedoch nicht aus, jeweils nur eine Komponente des mit CD14 interagierenden Systems von Rezeptoren und Molekülen isoliert zu betrachten, da evtl. vorhandene Zusammenhänge übersehen werden könnten. Wird nur ein Teil des Systems untersucht, hängt die Richtung eines Effektes möglicherweise von einem unerkannten Bias ab. Im Falle des CD14-Rezeptors könnten TLR2 und andere mit CD14 und TLR2 assoziierte Moleküle dieser Bias sein. Die Ergebnisse von Kormann et al., die bei der ISAAC Studienpopulation einen Effekt eines TLR2-Polymorphismus auf nichtatopisches Asthma und einen starken protektiven Effekt von Polymorphismen anderer mit TLR2 assoziierter TLR vor atopischem Asthma zeigen, unterstützen die Vermutung, dass ein Effekt nicht nur durch eine einzelne genetische Variante bedingt ist.

Weitere mögliche Ursachen für die zwischen den verschiedenen Studiengruppen kontroversen Ergebnisse zum Zusammenhang zwischen dem CD14 C-159T SNP und atopischen Phänotypen könnten in ethnischen Unterschieden sowie Altersunterschieden zwischen den Studienpopulationen liegen. Unsere Studienpopulationen bestehen ausschließlich aus Individuen deutscher Abstammung, so dass eine Beeinflussung der Resultate durch Stratifizierung der Population oder unterschiedliche genetische Hintergründe unwahrscheinlich erscheint. Die Richtung des genetischen Effekts war in den drei untersuchten Altersgruppen konsistent, so dass eine Effektmodifikation durch das unterschiedliche Alter der Probanden nicht zu erwarten ist. Allerdings könnten sich die drei Populationen erheblich in den Umweltbedingungen, unter denen die Münchner und Dresdner Kinder sowie die Erwachsenen aus Gießen bisher gelebt haben, unterscheiden. Über Unterschiede in den Umweltbedingungen, insbesondere während des Aufwachsens und während der Prägungsphase des angeborenen

Immunsystems, ist bei den von uns untersuchten Populationen nichts Genaues bekannt.

Ein weiterer möglicher Faktor, der unsere Ergebnisse beeinflusst haben könnte, wäre eine inkorrekte Phänotypdefinition. Die Definition der Phänotypen basierte auf Fragebögen, die durch die Eltern der untersuchten Kinder ausgefüllt wurden. Dabei ist man auf korrekte Antworten und eine sachgerechte Einschätzung des kindlichen Gesundheitsstatus durch die Eltern angewiesen. Da in der ISAAC Studie für die Phänotypen Asthma, Heuschnupfen und atopisches Ekzem das Vorhandensein einer ärztlichen Diagnose gefordert wurde sowie als objektive Messgrößen IgE und sCD14 im Serum herangezogen wurden, kann von einer ausreichenden Phänotypdefinition ausgegangen werden.

Im Gegensatz zu einer früheren holländischen Untersuchung konnten wir an unseren Populationen keine signifikante Assoziation von positiven Hautpricktest-Ergebnissen mit dem Genotyp CC des CD14 C-159T Polymorphismus beobachten. Allerdings war die Anzahl der getesteten Allergene in unserer Untersuchung limitiert auf sechs Allergene, während in der holländischen Studie 12 Allergene getestet wurden (Koppelman et al. 2001). Dies könnte den Nachweis von Unterschieden in der Zahl positiver Hautpricktests in unserer Analyse vergleichsweise erschwert haben.

Für den CD14 C-159T Polymorphismus wurden bisher zahlreiche Studien publiziert, die sich mit dem Zusammenhang zwischen dem SNP und allergieassoziierten Phänotypen wie Asthma, allergischen Erkrankungen, Atopie, IgE und sCD14 beschäftigen.

In der ersten Untersuchung zur Assoziation des CD14 C-159T Polymorphismus mit Atopie, die durch Baldini et al. 1999 publiziert wurde, schien der CD14 C-159T Polymorphismus bei homozygoten Individuen (TT) aus einer Population von Kindern in Tucson, Arizona, USA, zu einem erhöhten sCD14-Spiegel und einem erniedrigten Gesamt-IgE im Serum zu führen. Diese Assoziation konnte jedoch nur bei Kindern mit positivem Ergebnis des Hautpricktests beobachtet werden. Der von Baldini et al. gezeigte Effekt des CD14 C-159T SNP konnte durch einige, jedoch nicht durch alle weiteren Studien reproduziert werden. Eine holländische Gruppe von Erwachsenen zeigte erhöhte IgE-Spiegel und eine höhere Anzahl positiver Hautpricktests bei Trägern des CC-Genotyps (Koppelman et al. 2001). Eine Analyse bei einer Population chinesischer Kinder ergab erhöhte sCD14-Spiegel bei Trägern des TT-

Genotyps, aber keine Assoziation zwischen dem CD14-SNP und allergischer Sensibilisierung. In dieser Analyse zeigte sich bei den Trägern des Genotyps TT ein erhöhtes Gesamt-IgE im Serum gegenüber den anderen Genotypen (Leung et al. 2003). Ähnliche Resultate wurden bei australischen Kindern (O'Donnell et al. 2004) und indischen Populationen (Sharma et al. 2004) beobachtet. In mehreren Studien wurde die Assoziation des C-159T Polymorphismus mit dem Schweregrad von atopischen Erkrankungen (Koppelman et al. 2001) bzw. mit der Anfälligkeit für Atopie (Ober et al. 2000) beobachtet. In einer deutschen Population (Sengler et al. 2003) und in einer japanischen Studie (Gao et al. 1999) konnte keine Assoziation zwischen dem Polymorphismus und dem Serum IgE gefunden werden. Bei Mitarbeitern eines Tierversuchlabors in Maryland, USA, zeigte sich im Gegensatz zu Baldinis Beobachtung eine Assoziation von C-159T mit erhöhten IgE-Spiegeln (Amelung et al. 2000). Eine Untersuchung an einer Population von Hutteranern, einer ursprünglichen Glaubens- und Gütergemeinschaft in den USA und Kanada, zeigte eine positive Assoziation des T-Allels mit atopischer Sensibilisierung (Ober et al. 2000). In der Studienkohorte der German Multicenter Allergy Studie z.B. wurde keine Assoziation von C-159T mit Asthma, Atopie, Allergie oder dem IgE-Spiegel gefunden (Sengler et al. 2003). Auch bei einer Untersuchung von polnischen asthmaerkrankten Kindern konnte keine Assoziation zwischen dem C-159T Genotyp und dem IgE Spiegel im Serum oder bronchialer Hyperreagibilität festgestellt werden (Lis et al. 2001). Eine australische Studie ergab keine Assoziation des CD14-SNP mit Asthma und eine schwache Assoziation mit Atopie, wobei die Träger des T-Allels ein erhöhtes Risiko für Atopie aufzuweisen schienen (Kedda et al. 2005).

Das Fehlen einer Assoziation zwischen CD14-Genotypen und IgE sowie zwischen Genotyp und atopischem Phänotyp in unserer und anderen Studien (Sengler et al. 2003) macht einen direkten Einfluss von CD14-Genotypen auf die Atopieentstehung unwahrscheinlich. Die auf den ersten Blick inkonsistenten Studienergebnisse legen nahe, dass die untersuchte genetische Variation in der Promoterregion des CD14-Gens zumindest nicht alleine für die Entstehung atopieassoziiierter Phänotypen verantwortlich sein kann. Die Resultate führen zu der Vermutung, dass Gen-Gen-Interaktionen zwischen verschiedenen Kandidatengenen und Gen-Umwelt-Interaktionen zwischen Umweltfaktoren und dem CD14 C-159T SNP bei der Entwicklung atopischer Erkrankungen vorliegen könnten.

CD14 ist maßgeblich an der Erkennung von LPS beteiligt. Es wird vermutet, dass die Exposition eines Individuums gegenüber LPS einen entscheidenden Umweltfaktor in der Gen-Umwelt-Interaktion am CD14-Rezeptor darstellt. Daten aus einer Untersuchung an Schweizer Bauernkindern, in deren Umwelt eine hohe Endotoxin-Exposition besteht, zeigen Hinweise auf eine signifikant erhöhte Expression von CD14 und TLR2 (Lauener et al. 2002).

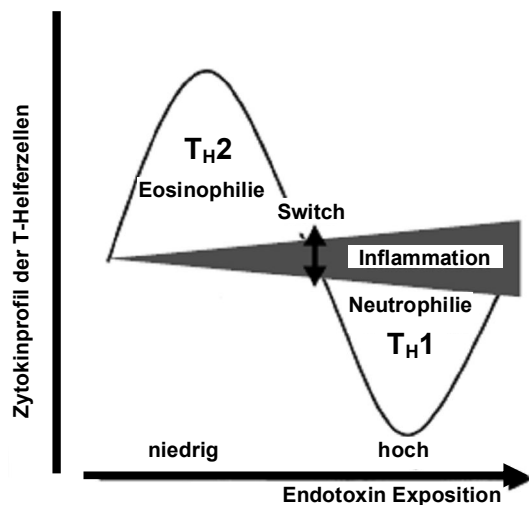
Die von Baldini et al. publizierten Ergebnisse führten zu der initialen Hypothese, dass Träger des TT-Genotyps des CD14 C-159T SNP weniger anfällig für die Entwicklung atopischer Erkrankungen sein könnten. Dies wurde damit erklärt, dass Träger des Genotyps TT durch die höhere Expression von sCD14 sensibler auf Umwelteinflüsse wie LPS reagieren könnten, die die Reaktion des Immunsystems weg von einer Dominanz des T<sub>H</sub>2-Systems bringen könnten (Vercelli et al. 2001). In einigen bisherigen Studien zeigte sich für den TT-Genotyp ein protektiver Effekt bei niedrigen Endotoxindosen und ein erhöhtes Risiko bei hoher Endotoxin-Exposition (Martinez 2007a).

In Verbindung mit einer hohen Endotoxin-Exposition schien andererseits in anderen Untersuchungen der CC-Genotyp vor Atopie zu schützen. Bei einer Studienpopulation von Bauernkindern und Kontrollkindern (ALEX Studie) waren die spezifischen IgE-Spiegel gegen inhalative Allergene stark invers assoziiert mit einer hohen Endotoxin-Exposition bei Trägern des CC-Genotyps. Bei für das C-Allel homozygoten Individuen waren dabei die spezifischen IgE-Spiegel bei niedriger Endotoxin-Exposition am höchsten (nicht signifikant) und bei hoher Endotoxin-Exposition am niedrigsten (signifikant) verglichen mit den anderen Genotypen (Eder et al. 2005). Bei einer Kohorte aus der „Manchester Asthma und Allergy Study“ zeigte sich ein signifikanter inverser Zusammenhang von hoher Endotoxin-Exposition mit dem Risiko allergischer Sensibilisierung und atopischem Ekzem für den Genotyp CC (Simpson et al. 2006). Bei einer Population von Erwachsenen in den USA wurde eine inverse Korrelation des Risikos für allergische Sensibilisierung zur Endotoxin-Exposition nur bei Trägern des CC-Genotyps (Williams et al. 2006) beobachtet.

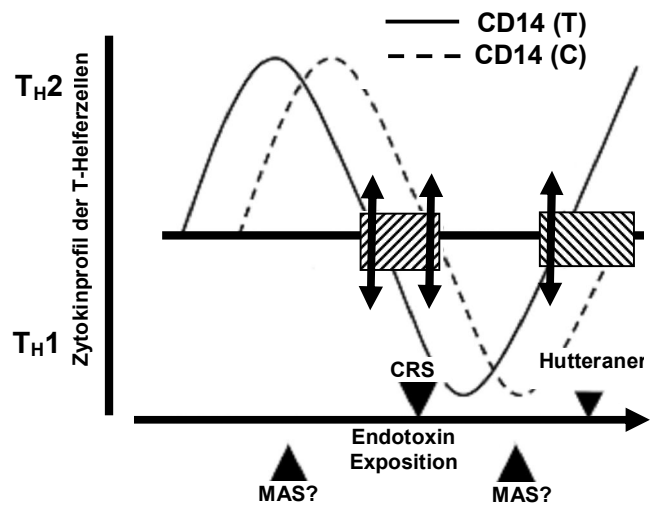
Der Genotyp des CD14 C-159T Polymorphismus, insbesondere das Vorliegen des T-Allels, könnte somit je nach Exposition des Individuums gegenüber mikrobiellen Produkten wie Endotoxin einerseits ein Risikofaktor für Atopie sein und andererseits einen protektiven Effekt vor atopischen Erkrankungen bieten (von Mutius et al. 2000).

Es wäre möglich, dass die CD14-Expression beim TT-Genotyp bei niedriger Endotoxin-Exposition gesteigert ist, bei hohen Endotoxindosen hingegen CD14 vermehrt bei Genotypen, die das C-Allel beinhalten, exprimiert wird (Martinez 2007a). Ein mögliches Erklärungsmodell hierfür bietet die Hypothese eines „Endotoxin-Switch“ (Vercelli 2003). Diese Hypothese postuliert eine Modulation der Immunreaktion und damit auch der IgE-Produktion durch die Exposition gegenüber Endotoxin. Demnach soll die Exposition gegenüber hohen Dosen von Endotoxin zu einer T<sub>H</sub>1-dominierten und die Exposition gegenüber niedrigen Dosen von Endotoxin zu einer T<sub>H</sub>2-dominierten Immunreaktion führen. Dies würde bedeuten, dass ein sogenannter "Endotoxin-Switch", d.h. ein Umschlagpunkt von T<sub>H</sub>2- zu T<sub>H</sub>1-dominierter Immunantwort bei einer bestimmten Dosis von Endotoxin existiert. Das gesteigerte Potential zur CD14-Produktion bei Trägern des T-Allels des CD14 C-159T Polymorphismus steuert die Immunreaktion in Richtung einer T<sub>H</sub>1-Dominanz, so dass sogar bei einer niedrigen Endotoxin-Exposition ein protektiver Effekt beobachtet werden könnte. In diesem Fall würde das T-Allel vor atopischen Erkrankungen schützen. Der Hypothese des „Endotoxin-Switch“ zufolge kommt es bei hoher Endotoxin-Exposition zu einem zweiten Umschlag von T<sub>H</sub>1- zu T<sub>H</sub>2-Dominanz, der bei Trägern des T-Allels eher auftritt als beim Genotyp CC. Somit wären bei einer hohen Endotoxin-Exposition Träger des T-Allels häufiger und Träger des Genotyps CC seltener mit atopischen Erkrankungen behaftet.

Abbildungen 15 und 16 sollen diese Hypothese schematisch verdeutlichen.



**Abbildung 15. Der Endotoxin Switch.**  
Die Kurve zeigt die bimotoale Beziehung zwischen Endotoxin Exposition und Art der Immunreaktion. In Höhe des Doppelpfeils besteht ein Umschlagpunkt (Switch) von einer Dominanz des  $T_H1$  zum  $T_H2$  System und vice versa.  
(adaptiert aus: Vercelli 2003)



**Abbildung 16. Der CD14 C-159T SNP und der Endotoxin Switch.**

Die beiden Kurven zeigen die allelabhängige Beziehung zwischen Endotoxin Exposition und Immunreaktion am Beispiel des CD14 C-159T SNP.

Die beiden schraffierten Flächen zeigen den Bereich, in dem die genetische Variation einen Einfluss auf die  $T_H$ -Zellreaktion haben könnte. Auf der X-Achse sind hypothetische Werte der Endotoxin Exposition für unterschiedliche Populationen aufgetragen.

MAS: Studienpopulation der deutschen Multicenter Allergy Study. CRS: Studienpopulation der Children Respiratory Study in Tucson, USA.

(adaptiert aus: Vercelli 2003)

Die Genetik im Sinne von Polymorphismen wie dem C-159T SNP könnte dabei Einfluss darauf nehmen, bei welcher Dosis von Endotoxin sich dieser Umschlagpunkt befindet. Nach dieser Theorie reagieren die T-Helfer-Zellen bei sehr niedrigen und sehr hohen Endotoxindosen in gleicher Weise, während in einem relativ engen Fenster dazwischen die Unterschiede in der Endotoxindosis einen großen Effekt auf die Ausprägung der dominierenden T-Helferzell-Subpopulation haben (Vercelli 2003).

Die Relevanz dieser Hypothese für die Ausprägung von Asthma wurde durch Zambelli-Weiner et al. untersucht. Diese Gruppe berichtete über eine starke antagonistische Interaktion zwischen der Höhe der Endotoxin-Exposition und dem CD14 C-159T SNP als Determinanten von Risiko und Schweregrad von Asthma. Bei Individuen, die einer niedrigen Endotoxin-Exposition ausgesetzt waren, schien der TT-Genotyp vor der Entwicklung von Asthma zu schützen. Bei hohen Endotoxindosen war das Risiko für Asthma bei Trägern des TT-Genotyps dagegen stark gesteigert gegenüber den Trägern des CC-Genotyps. Ebenso war der klinische Schweregrad der Asthmaerkrankung beim TT-Genotyp bei niedriger Endotoxin-Exposition signifikant weniger ausgeprägt, bei hoher Endotoxin-Exposition jedoch eher ausgeprägter als bei Trägern der anderen beiden Genotypen (Zambelli-Weiner et al. 2005). Nicht nur das Ausmaß der Endotoxin-Exposition, sondern auch der Zeitpunkt der Exposition scheint von entscheidender Bedeutung zu sein. Hier scheint die Endotoxin-Exposition in utero sowie in den ersten Lebensjahren besonders wichtig zu sein (Martinez and Holt 1999).

Es existieren keine Daten zur mikrobiellen Exposition bzw. zur Endotoxin-Exposition der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Populationen. Somit können die Population aus der ISAAC Studie und die Gießener Erwachsenenpopulation nicht in das Modell des „Endotoxin-Switch“ eingeordnet werden.

Die Vermutung, dass die Endotoxin-Exposition mit der Entstehung von Atopie zusammenhängt, macht eine Untersuchung dieses Zusammenhangs bei Populationen, die in ihrem Lebensraum einer hohen Endotoxin-Exposition ausgesetzt sind, besonders interessant. Die Endotoxin-Exposition im frühen Lebensalter ist bei Kindern, die auf einem Bauernhof aufwachsen, konstant hoch. Zudem ist bekannt, dass Bauernkinder weniger häufig an Allergien und Asthma erkranken.

In zwei der Bauernstudien, der ALEX und der PARSIFAL Studie, wurde bisher die Assoziation von genetischen Varianten im CD14-TLR2-System mit Atopie untersucht. Für die Studienpopulation der ALEX Studie liegen Daten zu Polymorphismen im CD14- und TLR2-Gen vor. Es zeigte sich ein inverser Zusammenhang des C-Allels des CD14 C-159T SNP mit Atopie und eine starke inverse Beziehung zwischen dem T-Allel des TLR2-540 SNP und Asthma und Allergien (Eder et al. 2004).

Bei der Population der PARSIFAL Studie konnte hingegen keine Assoziation des CD14 C-159T SNP mit Atopie gezeigt werden (Bieli et al. 2007). Für diese Population lagen bisher allerdings keine Daten zum Zusammenhang des TLR2-540 SNP mit atopischen Erkrankungen vor. Wir konnten durch unsere Untersuchung im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestätigen, dass dieser Polymorphismus eine wesentliche determinierende Rolle für Asthma und Allergien bei europäischen Bauernkindern zu spielen scheint. Jedoch war die Richtung der Assoziation gegenüber der früheren Analyse bei Kindern aus der ALEX Studie nicht reproduzierbar. Bei den Kindern aus der PARSIFAL Studie beobachteten wir eine Assoziation in die entgegengesetzte Richtung, nämlich eine positive Assoziation des T-Allels mit atopischen Phänotypen, die bezüglich aktueller Asthmasymptome und Atopie statistische Signifikanz erreichte. Auch nach Miteinbezug potentieller Störvariablen blieb die Assoziation für diese beiden Phänotypen signifikant. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der ALEX Studie konnten wir an unserer Population aus der PARSIFAL Studie keine signifikante Gen-Umwelt-Interaktion zwischen Bauernstatus und den atopieassoziierten Phänotypen nachweisen. In Einklang mit den Resultaten aus der ALEX Studie stellten wir auch in der PARSIFAL Studienpopulation keine Assoziation der anderen untersuchten Polymorphismen im TLR2-Gen mit atopischen Phänotypen fest.

Unsere Resultate widersprechen den Ergebnissen aus der ALEX Studie in mehreren Punkten. Die Frequenzen der Phänotypen bezogen auf die drei Genotypen des TLR2-540 SNP wiesen bei den Kontrollkindern und bei den Bauernkindern, die



Träger des T-Allels waren, zwar eine bemerkenswerte Ähnlichkeit zwischen der ALEX und der PARSIFAL Studie auf. Dagegen hatten die Bauernkinder mit dem Genotyp AA in der PARSIFAL Studie signifikant seltener Asthma, Asthmasymptome, Heuschnupfensymptome und signifikant weniger spezifisches IgE gegen Aeroallergene als die vergleichbare Gruppe in der ALEX Studie. Dieser Unterschied in der Frequenz der Phänotypen konnte nicht durch Unterschiede in den Umweltfaktoren auf dem Bauernhof (z.B. Kontakt zu Stalltieren, Hilfe bei der Heuernte, Häufigkeit des Stallaufenthaltes der Mutter während der Schwangerschaft) erklärt werden.

Wie in der vorliegenden Untersuchung hat sich in vielen bisherigen Studien zur Genetik von komplexen Erkrankungen wie Asthma und Allergien gezeigt, dass die Reproduktion der Resultate zwischen den verschiedenen Studien und den unterschiedlichen Populationen schwierig ist. Dies kann z.B. an unterschiedlichem Studiendesign, der Heterogenität der untersuchten Phänotypen oder auch an verschiedenen Umwelteinflüssen liegen (Martinez 2007b). Durch die Ähnlichkeit der Studienpopulationen und des Studiendesigns der ALEX Studie und PARSIFAL Studie war versucht worden, den Einfluss dieser Faktoren so gering wie möglich zu halten. In beiden Studien wurde beispielsweise die Definition der Phänotypen durch Fragebögen bestimmt, die durch die Eltern der Kinder ausgefüllt wurden, und die Messungen von spezifischem IgE gegen häufige Allergene wurden auf sehr ähnliche Art und Weise durchgeführt. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass die Resultate zumindest einiger Analysen durch die Beantwortung der Fragebögen und die Einschätzung des kindlichen Gesundheitsstatus durch die Eltern beeinflusst sein könnten. Im Falle der vorliegenden Untersuchung kann man beim Phänotyp Asthma durch die geforderte ärztliche Diagnose von einer ausreichenden Phänotypdefinition ausgehen. Auch beim Phänotyp Atopie, zu dessen Definition als objektive Messgröße die Bestimmung von spezifischem IgE im Serum herangezogen wurde, ist eine Beeinflussung durch eine unterschiedliche Beantwortung der Fragebögen nicht zu erwarten.

Die PARSIFAL Studie schloss Kinder aus Studienzentren bzw. -ländern (Schweiz, Schweden und Niederlande) ein, die an den genetischen Analysen im Rahmen der ALEX Studie nicht teilgenommen hatten. Allerdings konnte auch durch eine Beschränkung der Analysen auf Bauernkinder aus Deutschland und Österreich die Diskrepanz zwischen den Resultaten nicht erklärt werden. Die Möglichkeit von

Genotypisierungsfehlern wurde durch erneute Genotypisierung beider Populationen für den TLR2-540 Polymorphismus und das Y-Chromosom über unser Labor und das Arizona Respiratory Center in Tucson, USA, unter Verwendung unterschiedlicher Genotypisierungsmethoden ausgeschlossen.

Bei Replikationsstudien geht man von der Annahme aus, dass jede Studienpopulation repräsentativ für die Gesamtpopulation ist und somit Homogenität in Bezug auf Genetik und äußere Einflüsse besteht. Die Voraussetzung der Homogenität könnte bei komplexen Phänotypen wie z.B. atopischen Erkrankungen besonders bedeutsam sein, zumal bei diesen Phänotypen die Interaktionen zwischen Genetik und bestimmten Umweltfaktoren entscheidend beteiligt zu sein scheinen. Möglicherweise wird die Voraussetzung der Homogenität bei den beiden Studienpopulationen von Bauernkindern aus der ALEX und PARSIFAL Studie nicht ganz erfüllt. Die Prävalenzen für die Phänotypen der atopischen Sensibilisierung sind zwischen den beiden Studienpopulationen sehr unterschiedlich, was ein Hinweis auf Inhomogenität sein könnte.

Die Analysen im Rahmen der ALEX Studie bieten Hinweise darauf, dass der Genotyp AA des TLR2-540 Polymorphismus eine bedeutende Determinante von Asthma und Allergien bei Bauernkindern ist. Wenn das jedoch so ist, wären Variationen der Frequenz von Phänotypen auch am ehesten bei Trägern des Genotyps AA zu erwarten und weniger bei den anderen Genotypen. Somit könnte die fehlende Reproduktion der Richtung einer Assoziation zwischen dem Genotyp und den Phänotypen eher ein Hinweis auf eine Variation von Expositionen gegenüber Umweltfaktoren sein und nicht gegen eine potentielle funktionelle biologische Bedeutung sprechen. Die zugrunde liegenden Expositionsfaktoren, die mit TLR2-540 in der Atopieentstehung interagieren, sind noch unbekannt, da noch keine funktionellen Studien zu TLR2-540 oder zu Polymorphismen im Kopplungs-Ungleichgewicht mit TLR2-540 existieren.

Es wäre möglich, dass die vorliegenden Daten auf einen Einfluss noch nicht bekannter Umweltfaktoren hindeuten. Es besteht Bedarf an der Durchführung von funktionellen Studien zur Identifikation der kausalen Veränderungen und der potentiellen klinischen Relevanz unserer Untersuchungsergebnisse.

Die funktionelle Bedeutung des CD14-TLR2-Systems bei der Erkennung von LPS hat dazu geführt, dass CD14 und TLR2 als Kandidatengene für die Entstehung von Atopie angesehen werden. Die bisherige Studienlage bietet Hinweise darauf, dass genetische Veränderungen im CD14-TLR2-System Auswirkungen auf die Genexpression haben sowie die Ausprägung von Atopie bzw. die Höhe des IgE-Spiegels beeinflussen könnten. Bezüglich des genauen Effekts der unterschiedlichen genetischen Dispositionen jedoch sind die Resultate nicht eindeutig. Die bisher beobachteten Studienpopulationen unterscheiden sich stark in den Umweltbedingungen, denen sie ausgesetzt sind. Hier könnte im Sinne der Hygiene-Hypothese besonders die Menge an Mikroorganismen im jeweiligen Lebensraum und dabei vor allem das Ausmaß der Exposition gegenüber LPS einen Umweltfaktor darstellen, der zu einer Modulation der Immunantwort in Richtung einer  $T_H1$ -Dominanz führen könnte. Aufgrund der zentralen Rolle des CD14-TLR2-Systems bei der Vermittlung von LPS-induzierten Signalen ist es gut vorstellbar, dass genetische Veränderungen, die zur Veränderung der Funktion oder der Genexpression von CD14 und TLR2 führen, auch den protektiven Effekt der LPS-Exposition modifizieren könnten.

Nach dem heutigen Verständnis könnten die widersprüchlichen Studienresultate beim CD14 C-159T Polymorphismus durch das Modell des „Endotoxin-Switch“ zu erklären sein. Für die unterschiedlichen Effekte des CD14 C-159T SNP und des TLR2-540 Polymorphismus bei der ALEX und der PARSIFAL Population bietet dieses Modell jedoch keine Erklärung, da es sich bei beiden Populationen um Bauernkinder mit einer ähnlichen Endotoxin-Exposition handelt. Möglicherweise könnte hier die Größe der Studienpopulation, die bei der PARSIFAL Studie um einiges größer als bei der ALEX Studie ist, eine Rolle spielen.

Der komplexe Weg von einer Endotoxin-Stimulation zu einer IgE-vermittelten Immunantwort wird wahrscheinlich durch den Zeitpunkt der Stimulation sowie durch Interaktion mit anderen immunologischen Mechanismen und externen Faktoren reguliert. Somit könnte die Rolle von Polymorphismen im CD14-TLR2-System von anderen, bis jetzt nicht bekannten oder nicht ausreichend untersuchten Umweltfaktoren oder genetischen Faktoren abhängen.

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse und die bisherige Studienlage weisen darauf hin, dass das CD14-TLR2-System in Zusammenhang mit

der Entstehung atopischer Erkrankungen steht. Die Rezeptoren CD14 und TLR2 sind jedoch lediglich ein kleiner Teil eines komplizierten Gefüges von Molekülen und Signalwegen, die über Gen-Umwelt-Interaktionen Einfluss auf die Entwicklung von Asthma und Allergien nehmen könnten.

### 5. Zusammenfassung

Die stetige weltweite Zunahme der Prävalenz von atopischen Erkrankungen und Asthma bronchiale stellt eine große Beeinträchtigung für die Betroffenen und einen bedeutenden Kostenfaktor für die Gesundheitssysteme dar. Zur Entstehung von Asthma und allergischen Erkrankungen kommt es durch eine komplexe Interaktion von genetischer Prädisposition und Umweltfaktoren. Hierbei wird angenommen, dass die genetische Prädisposition zwar determiniert, innerhalb bestimmter Phasen in der Reifung des Immunsystems aber doch anpassungsfähig an bestimmte Expositionsfaktoren ist. Mustererkennungsrezeptoren des angeborenen Immunsystems wie das CD14-TLR2-Rezeptorsystem könnten in dieser Gen-Umwelt-Interaktion eine entscheidende Rolle spielen.

Aus der bisherigen Studienlage gibt es Hinweise darauf, dass genetische Varianten im CD14-TLR2-System mit der Entstehung atopischer Phänotypen assoziiert sein könnten. Für die Populationen der ISAAC Studie und der großen europäischen Bauernstudie PARSIFAL liegen zu dieser Assoziation bereits Daten für jeweils eine Komponente des Rezeptorsystems aus bisherigen Untersuchungen vor.

Aus diesem Grund erfolgten für die vorliegende Arbeit Genotypisierungen für Single Nucleotide Polymorphismen im CD14-TLR2-System bei den Populationen der ISAAC Studie und der Bauernstudie PARSIFAL zur Vervollständigung der Datenlage bei diesen Studienpopulationen. Die Ermittlung der atopischen Phänotypen erfolgte fragebogenbasiert. Die Genotypen wurden mit den atopischen Phänotypen und für die Population der ISAAC Studie mit den Spiegeln von sCD14 und IgE assoziiert.

Die Resultate bestätigen einen Zusammenhang zwischen dem CD14 C-159T Polymorphismus und der Expression von sCD14 bei der Population der ISAAC Studie. Wir konnten keine Assoziation des CD14 C-159T Polymorphismus mit dem Serumspiegel von IgE oder den weiteren untersuchten atopischen Phänotypen beobachten.

Es konnte zudem bestätigt werden, dass der TLR2-540 Polymorphismus eine bedeutende Rolle in der Asthma- und Allergieentstehung bei Bauernkindern einzunehmen scheint. In der vorliegenden Replikationsstudie war der Polymorphismus bei Bauernkindern mit einem erhöhten Atopierisiko assoziiert. Damit zeigte der Effekt des Polymorphismus genau in die entgegengesetzte Richtung als

in der früheren Analyse im Rahmen der ALEX Studie, in der der TLR2-540 Polymorphismus mit einer geringeren Atopieprävalenz bei Bauernkindern assoziiert war.

Die vorliegenden Daten weisen darauf hin, dass das CD14-TLR2-System als Kandidatengene des angeborenen Immunsystems über Interaktionen von Genetik und Umweltfaktoren die Entstehung von Asthma und Allergien regulieren könnte.

Weitere Untersuchungen zur genaueren Differenzierung von relevanten Umweltfaktoren sowie weitere funktionelle Studien könnten zur weiteren Klärung der zugrunde liegenden Mechanismen und zur Evaluation der potentiellen klinischen Relevanz der beobachteten Effekte führen.

## 6. Literaturverzeichnis

**Ahmad-Nejad P.**, Mrabet-Dahbi S., Breuer K., Klotz M., Werfel T., Herz U., Heeg K., Neumaier M., Renz H.

The toll-like receptor 2 R753Q polymorphism defines a subgroup of patients with atopic dermatitis having severe phenotype.

Journal of Allergy and Clinical Immunology 2004;113(3):565-7.

**Akira S.**, Hemmi H.

Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family.

Immunology Letters 2003;85(2):85-95.

**Akira S.**, Takeda K., Kaisho T.

Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity.

Nature Immunology 2001;2(8):675-80.

**Alfvén T.**, Braun-Fahrländer C., Brunekreef B., von Mutius E., Riedler J., Scheynius A., van Hage M., Wickman M., Benz M.R., Budde J., Michels K.B., Schram D., Ublagger E., Waser M., Pershagen G.; PARSIFAL study group.

Allergic diseases and atopic sensitization in children related to farming and anthroposophic lifestyle-the PARSIFAL study.

Allergy 2006;61(4):414-21.

**Amelung P.G.**, Weisch D.C., Xu J., Paigen B., Meyers A.D., Bleecker E.R.

A polymorphism in CD14 is associated with high IgE levels in a population with laboratory animal allergy.

American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 2000;161:A927.

**An H.**, Yu Y., Zhang M., Xu H., Qi R., Yan X., Liu S., Wang W., Guo Z., Guo J., Qin Z., Cao X.

Involvement of ERK, p38 and NF-kappaB signal transduction in regulation of TLR2, TLR4 and TLR9 gene expression induced by lipopolysaccharide in mouse dendritic cells.

Immunology 2002;106(1):38-45.

**Asher M.I.**, Keil U., Anderson H.R., Beasley R., Crane J., Martinez F. et al.

International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC): rationale and methods.

European Respiratory Journal 1995;8:483-491.

**Baldini M.**, Lohman I.C., Halonen M., Erickson R.P., Holt P.G., Martinez F.D.

A Polymorphism\* in the 5' flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum immunoglobulin E.

American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology 1999;20(5):976-83.

**Ball T.M.**, Castro-Rodriguez J.A., Griffith K.A., Holberg C.J., Martinez F.D., Wright A.L.

Siblings, day-care attendance, and the risk of asthma and wheezing during childhood.

New England Journal of Medicine 2000;343(8):538-43.

**Bazil V.**, Baudys M., Hilgert I., Stefanová I., Low M.G., Zbrozek J., Horejsí V.

Structural relationship between the soluble and membrane-bound forms of human monocyte surface glycoprotein CD14.

Molecular Immunology 1989;26(7):657-62.

**Bazil V.**, Strominger J.L.

Shedding as a mechanism of down-modulation of CD14 on stimulated human monocytes.  
Journal of Immunology 1991;147(5):1567-74.

**Belvin M.P.**, Anderson K.V.

A conserved signaling pathway: the Drosophila toll-dorsal pathway.  
Annual Review of Cell and Developmental Biology 1996;12:393-416.

**Bieli C.**, Eder W., Frei R., Braun-Fahrlander C., Klimecki W., Waser M., Riedler J., von Mutius E., Scheynius A., Pershagen G., Doekes G., Lauener R., Martinez F.D.; PARSIFAL study group.

A polymorphism in CD14 modifies the effect of farm milk consumption on allergic diseases and CD14 gene expression.

Journal of Allergy and Clinical Immunology 2007;120(6):1308-15.

**Braun-Fahrlander C.**, Gassner M., Grize L., Neu U., Sennhauser F.H., Varonier H.S., Vuille J.C., Wüthrich B.

Prevalence of hay fever and allergic sensitization in farmer's children and their peers living in the same rural community. SCARPOL team. Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory Symptoms with Respect to Air Pollution.

Clinical & Experimental Allergy 1999 Jan;29(1):28-34.

**Braun-Fahrlander C.**, Riedler J., Herz U., Eder W., Waser M., Grize L., Maisch S., Carr D., Gerlach F., Bufe A., Lauener R.P., Schierl R., Renz H., Nowak D., von Mutius E.

Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children.

New England Journal of Medicine 2002;347(12):869-77.

**Bufler P.**, Stiegler G., Schuchmann M., Hess S., Krüger C., Stelter F., Eckerskorn C., Schütt C., Engelmann H.

Soluble lipopolysaccharide receptor (CD14) is released via two different mechanisms from human monocytes and CD14 transfectants.

European Journal of Immunology 1995;25(2):604-10.

**Burrows B.**, Martinez F.D., Halonen M., Barbee R.A., Cline M.G.

Association of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergens.

New England Journal of Medicine 1989;320(5):271-7.

**Caramalho I.**, Lopes-Carvalho T., Ostler D., Zelenay S., Haury M., Demengeot J.

Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide.

Journal of Experimental Medicine 2003;197(4):403-11.

**Calvano J.E.**, Agnese D.M., Um J.Y., Goshima M., Singhal R., Coyle S.M., Reddell M.T., Kumar A., Calvano S.E., Lowry S.F.

Modulation of the lipopolysaccharide receptor complex (CD14, TLR4, MD-2) and toll-like receptor 2 in systemic inflammatory response syndrome-positive patients with and without infection: relationship to tolerance.

Shock 2003;20(5):415-9.

**Cook D.G.**, Strachan D.P..

Parental smoking, bronchial reactivity and peak flow variability in children.

Thorax 1998;53(4):295-301.



**David G.L.**, Romieu I., Sienra-Monge J.J., Collins W.J., Ramirez-Aguilar M., del Rio-Navarro B.E., Reyes-Ruiz N.I., Morris R.W., Marzec J.M., London S.J.  
Nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate) reduced:quinone oxidoreductase and glutathione S-transferase M1 polymorphisms and childhood asthma.  
American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 2003;168(10):1199-204.

**Ding C.**, Cantor C.R.

A high-throughput gene expression analysis technique using competitive PCR and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight MS.  
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2003;100;3059-3064.

**Dobrovolskaia M.A.**, Vogel S.N.

Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS.  
Microbes and Infection 2002;4(9):903-14.

**Duffy D.L.**, Martin N.G., Battistutta D., Hopper J.L., Mathews J.D.

Genetics of asthma and hay fever in Australian twins.  
American Review of Respiratory Disease 1990;142:1351-8.

**Droste J.H.**, Kerhof M., de Monchy J.G., Schouten J.P., Rijcken B.

Association of skin test reactivity, specific IgE, total IgE, and eosinophils with nasal symptoms in a community-based population study. The Dutch ECRHS Group.  
Journal of Allergy and Clinical Immunology 1996;97(4):922-32.

**Durieux J.J.**, Vita N., Popescu O., Guette F., Calzada-Wack J., Munker R., Schmidt R.E., Lupker J., Ferrara P., Ziegler-Heitbrock H.W., et al.

The two soluble forms of the lipopolysaccharide receptor, CD14: characterization and release by normal human monocytes.  
European Journal of Immunology 1994;24(9):2006-12.

**Eder W.**, Klimecki W., Yu L., von Mutius E., Riedler J., Braun-Fahrlander C., Nowak D., Martinez F.D.; ALEX Study Team.

Toll-like receptor 2 as a major gene for asthma in children of European farmers.  
Allergy and Clinical Immunology 2004;113(3):482-8.

**Eder W.**, Klimecki W., Yu L., von Mutius E., Riedler J., Braun-Fahrlander C., Nowak D., Martinez F.D.; ALEX Study Team.

Opposite effects of CD 14/-260 on serum IgE levels in children raised in different environments.  
Journal of Allergy and Clinical Immunology 2005;116(3):601-7.

**Edfors-Lubs M.L.**

Allergy in 7000 twin pairs.  
Acta Allergologica 1971;26(4):249-85.

**Ege M.J.**, Bieli C., Frei R., van Strien R.T., Riedler J., Ublagger E., et al.

Prenatal farm exposure is related to the expression of receptors of the innate immunity and to atopic sensitization in school-age children.  
Journal of Allergy and Clinical Immunology 2006;117:817-823.

**Ege M.J.**, Frei R., Bieli C., Schram-Bijkerk D., Waser M., Benz M.R., Weiss G., Nyberg F., van Hage M., Pershagen G., Brunekreef B., Riedler J., Lauener R., Braun-Fahrlander C., von Mutius E., PARSIFAL Study team.

Not all farming environments protect against the development of asthma and wheeze in children.

Journal of Allergy and Clinical Immunology 2007;119(5):1140-7.

**Ertel W.**, Kremer J.P., Kenney J., Steckholzer U., Jarrar D., Trentz O., Schildberg F.W. Downregulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients. Blood 1995;85(5):1341-7.

**Fearon D.T.**, Locksley R.M.

The instructive role of innate immunity in the acquired immune response.

Science 1996;272(5258):50-3.

**Finkelman F.D.**, Katona I.M., Urban J.F. Jr., Holmes J., Ohara J., Tung A.S., Sample J.V., Paul W.E.

IL-4 is required to generate and sustain in vivo IgE responses.

Journal of Immunology 1988;141(7):2335-41.

**Flo T.H.**, Halaas O., Torp S., Ryan L., Lien E., Dybdahl B., Sundan A., Espevik T.

Differential expression of Toll-like receptor 2 in human cells.

Journal of Leukocyte Biology 2001;69(3):474-81.

**Frey E.A.**, Miller D.S., Jahr T.G., Sundan A., Bazil V., Espevik T., Finlay B.B., Wright S.D. Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide.

Journal of Experimental Medicine 1992;176(6):1665-71.

**Gao P.S.**, Mao X.Q., Baldini M., Roberts M.H., Adra C.N., Shirakawa T., Holt P.G., Martinez F.D., Hopkin J.M.

Serum total IgE levels and CD14 on chromosome 5q31.

Clinical Genetics 1999;56(2):164-5.

**Ghosh S.**, May M.J., Kopp E.B.

NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses.

Annual Review of Immunology 1998;16:225-60.

**Gay N.J.**, Keith F.J.

Drosophila Toll and IL-1 receptor.

Nature 1991;351(6325):355-6.

**Gilliland F.D.**, Li Y.F., Saxon A., Diaz-Sanchez D.

Effect of glutathione-S-transferase M1 and P1 genotypes on xenobiotic enhancement of allergic responses: randomised, placebo-controlled crossover study.

Lancet 2004;363(9403):119-25.

**Gohlke H.**

Genetische Assoziation von SNPs in IL1RN mit Asthma bronchiale.

München, Technische Universität, Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt, Dissertation, 2004.

**Goyert S.M.**, Ferrero E., Rettig W.J., Yenamandra A.K., Obata F., Le Beau M.M.

The CD14 monocyte differentiation antigen maps to a region encoding growth factors and receptors.

Science 1988;239(4839):497-500.

**Graves P.E.**, Kabesch M., Halonen M., Holberg C.J., Baldini M., Fritzsche C., Weiland S.K., Erickson R.P., von Mutius E., Martinez F.D.

A cluster of seven tightly linked polymorphisms in the IL-13 gene is associated with total serum IgE levels in three populations of white children.  
Journal of Allergy and Clinical Immunology 2000;105(3):506-13.

**Griffin T.J.**

Single-nucleotide polymorphism analysis by MALDI-TOF mass spectrometry.  
Trends in Biotechnology 2000;18:77-84.

**Harris J.R.**, Magnus P., Samuelsen S.O., Tambs K.

No evidence for effects of family environment on asthma. A retrospective study of Norwegian twins.  
American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 1997;156(1):43-9.

**Hartl D.L., Clark A.G.**

Principles of population genetics.  
Sinauer Associates 1997, 3.Auflage.

**Hartmer R.**, Storm N., Boecker S., Rodi C.P., Hillenkamp F., Jurinke C., van den Boom D.

RNase T1 mediated base-specific cleavage and MALDI-TOF MS for high-throughput comparative sequence analysis.  
Nucleic Acids Research 2003;31:1-10.

**Hasemann K.**

Untersuchung der Gen-Umwelt-Interaktion in der Pathogenese allergischer Erkrankungen am Beispiel des CD14 Gens, Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin, Universitätsklinikum Gießen 2006.

**Heine H.**, Kirschning C.J., Lien E., Monks B.G., Rothe M., Golenbock D.T.

Cutting edge: cells that carry A null allele for toll-like receptor 2 are capable of responding to endotoxin.  
Journal of Immunology 1999;162(12):6971-5.

**Hillenkamp F.**, Karas M., Beavis R.C., Chait B.T.

Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers.  
Analytic Chemistry 1991;63:1193A-1203A.

**Hirschfeld M.**, Weis J.J., Toshchakov V., Salkowski C.A., Cody M.J., Ward D.C.,

Qureshi N., Michalek S.M., Vogel S.N.

Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages.  
Infection and Immunity 2001;69(3):1477-82.

**Hoffmann J.A.**, Kafatos F.C., Janeway C.A., Ezekowitz R.A.

Phylogenetic perspectives in innate immunity.  
Science 1999;284(5418):1313-8.

**Hopp R.J.**, Bewtra A.K., Watt G.D., Nair N.M., Townley R.G.

Genetic analysis of allergic disease in twins.  
Journal of Allergy and Clinical Immunology 1984;73(2):265-70.

**Hubacek J.A.**, Rothe G., Pit'ha J., Skodová Z., Staněk V., Poledne R., Schmitz G.  
C(-260)-->T polymorphism in the promoter of the CD14 monocyte receptor gene as a risk factor for myocardial infarction.  
Circulation 1999 ;99(25):3218-20.

**Ivaschenko T.E.**, Sideleva O.G., Baranov V.S.  
Glutathione- S-transferase micro and theta gene polymorphisms as new risk factors of atopic bronchial asthma.  
Journal of Molecular Medicine 2002;80(1):39-43.

**Janeway, C. A.**, Travers, Walport, Shlomchik, et al.  
Immunobiology, the immune system in health and disease.  
Garland Science Publishing 2005, 6.Auflage.

**Janeway C.A. Jr.**  
Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology.  
Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 1989;54:1-13.

**Jarrett E.**, Bazin H.  
Elevation of total serum IgE in rats following helminth parasite infection.  
Nature 1974;251(5476):613-4.

**Kabesch M.**  
Gene by environment interactions and the development of asthma and allergy.  
Toxicology Letters 2006a;162(1):43-8.

**Kabesch M.**  
A glitch in the switch? Of endotoxin, CD14, and allergy.  
American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 2006b;174(4):365-6.

**Kabesch M.**, Hoefler C., Carr D., Leupold W., Weiland S.K., von Mutius E.  
Glutathione S transferase deficiency and passive smoking increase childhood asthma.  
Thorax 2004;59(7):569-73.

**Kabesch M.**  
Genetik von Asthma und Atopie.  
Monatsschrift Kinderheilkunde 2004;152:1202–1210

**Kabesch M.**, Lauener R.P.  
Why Old McDonald had a farm but no allergies: genes, environments, and the hygiene hypothesis.  
Journal of Leukocyte Biology 2004;75(3):383-7.

**Kabesch M.**, von Mutius E.  
Prävention bei Asthma bronchiale im Kindesalter.  
Deutsche Medizinische Wochenschrift 2002;127(28-29):1506-8.

**Kaisho T.**, Akira S.  
Toll-like receptors and their signaling mechanism in innate immunity.  
Acta Odontologica Scandinavica 2001;59(3):124-30.

**Karas M.**, Hillenkamp F.  
Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10 000 Daltons.  
Analytic Chemistry 1988;60:259-280.

**Kay A.B.**

Allergy and allergic diseases. First of two parts.  
New England Journal of Medicine 2001;344(1):30-7.

**Kedda M.A.**, Lose F., Duffy D., Bell E., Thompson P.J., Upham J.

The CD14 C-159T polymorphism is not associated with asthma or asthma severity in an Australian adult population.  
Thorax 2005;60(3):211-4.

**Kirpekar F.**, Nordhoff E., Larsen L.K., Kristansen K., Roepstorff P., Hillenkamp F.

DNA sequence analysis by MALDI mass spectrometry.  
Nucleic Acids Research 1998;26:2554-2559.

**Kirschning C.J.**, Wesche H., Merrill Ayres T., Rothe M.

Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide.  
Journal of Experimental Medicine 1998;188(11):2091-7.

**Koppelman G.H.**, Reijmerink N.E., Colin Stine O., Howard T.D., Whittaker P.A., Meyers D.A., Postma D.S., Bleecker E.R.

Association of a promoter polymorphism of the CD14 gene and atopy.  
American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 2001;163(4):965-9.

**Kormann M.S.**, Depner M., Hartl D., Klopp N., Illig T., Adamski J., Vogelberg C., Weiland S.K., von Mutius E., Kabesch M.

Toll-like receptor heterodimer variants protect from childhood asthma.  
Journal of Allergy and Clinical Immunology 2008;122(1):86-92.

**Landmann R.**, Knopf H.P., Link S., Sansano S., Schumann R., Zimmerli W.

Human monocyte CD14 is upregulated by lipopolysaccharide.  
Infection and Immunity 1996;64(5):1762-9.

**Lauener R.P.**, Birchler T., Adamski J., Braun-Fahrlander C., Bufe A., Herz U., von Mutius E., Nowak D., Riedler J., Waser M., Sennhauser F.H.; ALEX study group.

Expression of CD14 and Toll-like receptor 2 in farmers' and non-farmers' children.  
Lancet 2002;360(9331):465-6.

**Lenz A.** et al.

Methodensammlung der Doktoranden des Allergogenetischen Labors im Forschungszentrum „Kubus“ des Dr. von Haunerschen Kinderspitals, Abschnitt über MALDI-TOF erstellt von A. Lenz (2006).

**Leung T.F.**, Tang N.L., Sung Y.M., Li A.M., Wong G.W., Chan I.H., Lam C.W.

The C-159T polymorphism in the CD14 promoter is associated with serum total IgE concentration in atopic Chinese children.  
Pediatric Allergy and Immunology 2003;14(4):255-60.

**Leushner J.**

MALDI TOF mass spectrometry: an emerging platform for genomics and diagnostics.  
Expert Review of Molecular Diagnostics 2001;1:11-18.

**LeVan T.D.**, Bloom J.W., Bailey T.J., Karp C.L., Halonen M., Martinez F.D., Vercelli D.

A common single nucleotide polymorphism in the CD14 promoter decreases the affinity of Sp protein binding and enhances transcriptional activity.  
Journal of Immunology 2001;167(10):5838-44.

**LeVan T.D.**, Von Essen S., Romberger D.J., Lambert G.P., Martinez F.D., Vasquez M.M., Merchant J.A.

Polymorphisms in the CD14 gene associated with pulmonary function in farmers.  
American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 2005;171(7):773-9.

**Lis G.**, Kostyk E., Sanak M., Pietrzyk J.J.

Molecular studies in a population of children with bronchial asthma. I. Polymorphism in the promotor region of gene CD14. Artikel auf Polnisch.  
Pneumonologia i Alergologie Polska 2001;69(5-6):265-72.

**Little D.P.**, Braun A., O'Donnell M.J., Koster H.

Mass spectrometry from miniaturized arrays for full comparative DNA analysis.  
Nature Medicine 1997;3:1413-1416.

**Lohmueller K.E.**, Pearce C.L., Pike M., Lander E.S., Hirschhorn J.N.

Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease.  
Nature Genetics 2003;33(2):177-82.

**Maliszewski C.R.**

CD14 and immune response to lipopolysaccharide.  
Science 1991;252(5010):1321-2.

**Mallol J.**, Solé D., Asher I., Clayton T., Stein R., Soto-Quiroz M.

Prevalence of asthma symptoms in Latin America: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC).  
Pediatric Pulmonology 2000;30(6):439-44.

**Marbury M.C.**, Maldonado G., Waller L.

Lower respiratory illness, recurrent wheezing, and day care attendance.  
American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 1997;155(1):156-61.

**Marchant A.**, Duchow J., Delville J.P., Goldman M.

Lipopolysaccharide induces up-regulation of CD14 molecule on monocytes in human whole blood.  
European Journal of Immunology 1992;22(6):1663-5.

**Martinez F.D.**

CD14, endotoxin, and asthma risk: actions and interactions.  
Proceedings of the American Thoracic Society 2007a;4(3):221-5.

**Martinez F.D.**

Gene-environment interactions in asthma: with apologies to William of Ockham.  
Proceedings of the American Thoracic Society 2007b;4(1):26-31.

**Martinez F.D.**, Holberg C.J.

Segregation analysis of physician-diagnosed asthma in Hispanic and non-Hispanic white families.  
Clinical & Experimental Allergy 1995;25(Suppl.2):68-70.

**Martinez F.D.**, Holt P.G.

Role of microbial burden in aetiology of allergy and asthma.  
Lancet 1999;354(Suppl.2):12-5.

**Marsh D.G.**, Neely J.D., Breazeale D.R., Ghosh B., Freidhoff L.R., Ehrlich-Kautzky E., Schou C., Krishnaswamy G., Beaty T.H.  
Linkage analysis of IL4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations.  
Science 1994;264(5162):1152-6.

**Matsuguchi T.**, Musikachoen T., Ogawa T., Yoshikai Y.  
Gene expressions of Toll-like receptor 2, but not Toll-like receptor 4, is induced by LPS and inflammatory cytokines in mouse macrophages.  
Journal of Immunology 2000;165(10):5767-72.

**Medzhitov R.**  
Toll-like receptors and innate immunity.  
Nature Reviews Immunology 2001;1(2):135-45.

**Medzhitov R.**, Janeway C.A. Jr.  
Innate immunity: impact on the adaptive immune response.  
Current Opinion in Immunology 1997;9(1):4-9.

**Medzhitov R.**, Preston-Hurlburt P., Janeway C.A. Jr.  
A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity.  
Nature 1997;388(6640):394-7.

**Miller S.A.**, Dykes D.D., Polesky H.F.  
A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.  
Nucleic Acids Research 1988;16(3):1215.

**Muzio M.**, Bosisio D., Polentarutti N., D'amico G., Stoppacciaro A., Mancinelli R., van't Veer C., Penton-Rol G., Ruco LP., Allavena P., Mantovani A.  
Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells.  
Journal of Immunology 2000;164(11):5998-6004.

**Nicolai T.**, von Mutius E.  
Respiratory hypersensitivity and environmental factors: East and West Germany.  
Toxicology Letters 1996;86(2-3):105-13.

**Ober C.**, Tsalenko A., Parry R., Cox N.J.  
A second-generation genomewide screen for asthma-susceptibility alleles in a founder population.  
The American Journal of Human Genetics 2000;67(5):1154-62.

**O'Donnell A.R.**, Toelle B.G., Marks G.B., Hayden C.M., Laing I.A., Peat J.K., Goldblatt J., Le Souëf PN.  
Age-specific relationship between CD14 and atopy in a cohort assessed from age 8 to 25 years.  
American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 2004;169(5):615-22.

**Ollikainen T.**, Hirvonen A., Norppa H.  
Influence of GSTT1 genotype on sister chromatid exchange induction by styrene-7,8-oxide in cultured human lymphocytes.  
Environmental and Molecular Mutagenesis 1998;31(4):311-5.

- Panhuysen C.I.**, Bleecker E.R., Koeter G.H., Meyers D.A., Postma D.S.  
Characterization of obstructive airway disease in family members of probands with asthma.  
An algorithm for the diagnosis of asthma.  
American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 1998;157:1734-42.
- Pusch W.**, Wurmbach J.H., Thiele H., Kostrzewa M.  
MALDI-TOF mass spectrometry-based SNP genotyping.  
Pharmacogenomics 2002;3:537-548.
- Radon K.**, Windstetter D., Eckart J., Dressel H., Leitritz L., Reichert J., Schmid M., Praml G., Schosser M., von Mutius E., Nowak D.  
Farming exposure in childhood, exposure to markers of infections and the development of atopy in rural subjects.  
Clinical & Experimental Allergy 2004;34(8):1178-83.
- Riedler J.**, Braun-Fahrlander C., Eder W., Schreuer M., Waser M., Maisch S., Carr D., Schierl R., Nowak D., von Mutius E.; ALEX Study Team.  
Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey.  
Lancet 2001;358(9288):1129-33.
- Riva A.**, Kohane I.S.  
SNPper: retrieval and analysis of human SNPs.  
Bioinformatics 2002;18:1681-1685.
- Rock F.L.**, Hardiman G., Timans J.C., Kastelein R.A., Bazan J.F.  
A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll.  
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1998;95(2):588-93.
- Romagnani S.**  
Human TH1 and TH2 subsets: regulation of differentiation and role in protection and immunopathology.  
International Archives of Allergy and Immunology 1992;98(4):279-85.
- Rook G.A.**, Stanford J.L.  
Give us this day our daily germs.  
Immunology Today 1998;19(3):113-6.
- Sampogna F.**, Demenais F., Hochez J., Oryszczyn M.P., Maccario J., Kauffmann F., Feingold J., Dizier M.H.  
Segregation analysis of IgE levels in 335 French families (EGEA) using different strategies to correct for the ascertainment through a correlated trait (asthma).  
Genetic Epidemiology 2000;18(2):128-42.
- Schaub B.**, Lauener R., von Mutius E.  
The many faces of the hygiene hypothesis.  
Journal of Allergy and Clinical Immunology 2006;117(5):969-77.
- Schumann R.R.**, Rietschel E.T., Loppnow H.  
The role of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein (LBP) in the activation of different cell types by endotoxin.  
Medical Microbiology and Immunology 1994;183(6):279-97.



**Sears M.R.**, Burrows B., Flannery E.M., Herbison G.P., Hewitt C.J., Holdaway M.D.  
Relation between airway responsiveness and serum IgE in children with asthma and in apparently normal children.  
New England Journal of Medicine 1991;325(15):1067-71.

**Sengler C.**, Haider A., Sommerfeld C., Lau S., Baldini M., Martinez F., Wahn U., Nickel R.; German Multicenter Allergy Study Group.  
Evaluation of the CD14 C-159 T polymorphism in the German Multicenter Allergy Study cohort.  
Clinical & Experimental Allergy 2003;33(2):166-9.

**Seibl R.**, Birchler T., Loeliger S., Hossle J.P., Gay R.E., Saurenmann T., Michel B.A., Seger R.A., Gay S., Lauener R.P.  
Expression and regulation of Toll-like receptor 2 in rheumatoid arthritis synovium.  
American Journal of Pathology 2003;162(4):1221-7.

**Sharma M.**, Batra J., Mabalirajan U., Goswami S., Ganguly D., Lahkar B., Bhatia N.K., Kumar A., Ghosh B.  
Suggestive evidence of association of C-159T functional polymorphism of the CD14 gene with atopic asthma in northern and northwestern Indian populations.  
Immunogenetics 2004;56(7):544-7.

**Sheehan D.**, Meade G., Foley V.M., Dowd C.A.  
Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily.  
Biochemical Journal 2001;360:1-16.

**Simpson A.**, John S.L., Jury F., Niven R., Woodcock A., Ollier W.E., Custovic A.  
Endotoxin exposure, CD14, and allergic disease: an interaction between genes and the environment.  
American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 2006;174(4):386-92.

**Storm N.**, Darnhofer-Patel B., van den Boom D., Rodi C.P.  
MALDI-TOF mass spectrometry-based SNP genotyping.  
Methods in Molecular Biology 2003;212:241-262.

**Strachan D.P.**  
Hay fever, hygiene, and household size.  
British Medical Journal 1989;299(6710):1259-60.

**Strachan D.P.**  
Allergy and family size: a riddle worth solving.  
Clinical & Experimental Allergy 1997;27(3):235-6.

**Strachan D.P.**  
Family size, infection and atopy: the first decade of the "hygiene hypothesis".  
Thorax 2000;55(Suppl. 1):2-10.

**Sutton B.J.**, Gould H.J.  
The human IgE network.  
Nature 1993;366(6454):421-8.

**Takeuchi O.**, Hoshino K., Kawai T., Sanjo H., Takada H., Ogawa T., Takeda K., Akira S.  
Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components.  
Immunity 1999;11(4):443-51.

**The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee.**

Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC.  
Lancet 1998;351(9111):1225-32.

**van Poppel G.**, de Vogel N., van Balderen P.J., Kok F.J.  
Increased cytogenetic damage in smokers deficient in glutathione S-transferase isozyme mu.  
Carcinogenesis 1992;13(2):303-5.

**Vercelli D.**

Learning from discrepancies: CD14 polymorphisms, atopy and the endotoxin switch.  
Clinical & Experimental Allergy 2003;33(2):153-5.

**Vercelli D.**, Baldini M., Martinez F.

The monocyte/IgE connection: may polymorphisms in the CD14 gene teach us about IgE regulation?  
International Archives of Allergy and Immunology 2001;124(1-3):20-4.

**von Ehrenstein O.S.**, Von Mutius E., Illi S., Baumann L., Böhm O., von Kries R.

Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers.  
Clinical & Experimental Allergy 2000;30(2):187-93.

**von Mutius E.**, Braun-Fahrlander C., Schierl R., Riedler J., Ehlermann S., Maisch S., Waser M., Nowak D.

Exposure to endotoxin or other bacterial components might protect against the development of atopy.  
Clinical & Experimental Allergy 2000;30(9):1230-4.

**von Mutius E.**, Fritzsche C., Weiland S.K., Röhl G., Magnussen H.

Prevalence of asthma and allergic disorders among children in united Germany: a descriptive comparison.  
British Medical Journal 1992;305(6866):1395-9.

**von Mutius E.**, Martinez F.D., Fritzsche C., Nicolai T., Roell G., Thiemann H.H.

Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany.  
American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 1994;149:358-64.

**Watari M.**, Watari H., Nachamkin I., Strauss JF..

Lipopolysaccharide induces expression of genes encoding pro-inflammatory cytokines and the elastin-degrading enzyme, cathepsin S, in human cervical smooth-muscle cells.  
Reproductive Sciences 2000;7(3):190-8.

**Weidinger S.**, Novak N., Klopp N., Baurecht H., Wagenpfeil S., Rummeler L., Ring J., Behrendt H., Illig T.

Lack of association between Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 polymorphisms and atopic eczema.  
Journal of Allergy and Clinical Immunology 2006;118(1):277-9.

**Werner M.**, Topp R., Wimmer K., Richter K., Bischof W., Wjst M., Heinrich J.  
TLR4 gene variants modify endotoxin effects on asthma.  
Journal of Allergy and Clinical Immunology 2003;112(2):323-30.

**Werts C.**, Tapping R.I., Mathison J.C., Chuang T.H., Kravchenko V., Saint Girons I., Haake D.A., Godowski P.J., Hayashi F., Ozinsky A., Underhill D.M., Kirschning C.J., Wagner H., Aderem A., Tobias P.S., Ulevitch R.J.  
Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism.  
Nature Immunology 2001;2(4):346-52.

**Wickman M.**, Kull I., Pershagen G., Nordvall S.L.  
The Bamse project: presentation of a prospective longitudinal birth cohort study.  
Pediatric Allergy and Immunology 2002;13(Suppl. 15):11–13.

**Williams L.K.**, McPhee R.A., Ownby D.R., Peterson E.L., James M., Zoratti E.M., Johnson C.C.  
Gene-environment interactions with CD14 C-260T and their relationship to total serum IgE levels in adults.  
Journal of Allergy and Clinical Immunology 2006;118(4):851-7.

**Wright S.D.**  
CD14: a leukocyte membrane protein that functions in the response to endotoxin.  
The FASEB Journal 1990;4:A1848.

**Wright S.D.**  
CD14 and innate recognition of bacteria.  
Journal of Immunology 1995;155(1):6-8.

**Wright S.D.**, Ramos R.A., Tobias P.S., Ulevitch R.J., Mathison J.C.  
CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein.  
Science 1990;249(4975):1431-3.

**Yang R.B.**, Mark M.R., Gray A., Huang A., Xie M.H., Zhang M., Goddard A., Wood W.I., Gurney A.L., Godowski P.J.  
Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling.  
Nature 1998;395(6699):284-8.

**Yang R.B.**, Mark M.R., Gurney A.L., Godowski P.J.  
Signaling events induced by lipopolysaccharide-activated toll-like receptor 2.  
Journal of Immunology 1999;163(2):639-43.

**Zambelli-Weiner A.**, Ehrlich E., Stockton M.L., Grant A.V., Zhang S., Levett P.N., Beaty T.H., Barnes K.C.  
Evaluation of the CD14/-260 polymorphism and house dust endotoxin exposure in the Barbados Asthma Genetics Study.  
Journal of Allergy and Clinical Immunology 2005;115(6):1203-9.

**Zhang L.**, Cui X., Schmitt K., Hubert R., Navidi W., Arnheim N.  
Whole genome amplification from a single cell: Implications for genetic analysis.  
Proceedings of the National Academy of Sciences USA 1992; 89: 5847-5851.

## 7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Liganden des Toll-like-Rezeptors 2 (TLR2).	16
Tabelle 2:	Komponenten des PCR-Ansatzes.	34
Tabelle 3:	Temperaturbedingungen der PCR-Reaktion.	34
Tabelle 4:	Komponenten der PCR-Reaktion im Rahmen der hME-Methode.	40
Tabelle 5:	Primer für die PCR-Reaktion im Rahmen der hME-Methode.	41
Tabelle 6:	Temperaturbedingungen der PCR-Reaktion im Rahmen der hME-Methode.	41
Tabelle 7:	Komponenten der SAP-Reaktion.	42
Tabelle 8:	Temperaturbedingungen der SAP-Reaktion.	42
Tabelle 9:	Komponenten der PCR für die Primer-Extensions-Reaktion.	43
Tabelle 10:	Temperaturbedingungen der Primer-Extensions-Reaktion.	43
Tabelle 11:	Datenlage zum CD14-TLR2-System.	49
Tabelle 12:	Deskriptive Charakteristika der Studienpopulation aus der ISAAC Studie.	50
Tabelle 13:	Frequenzen der Genotypen bzw. der Allele des CD14 C-159T Polymorphismus in der Studienpopulation.	52
Tabelle 14:	Prävalenzen atopischer Erkrankungen in der ISAAC Studienpopulation und der Population Erwachsener aus Gießen.	56
Tabelle 15:	Deskriptive Charakteristika der Studienpopulation aus der PARSIFAL Studie.	57
Tabelle 16:	Frequenzen der Phänotypen bei Bauernkindern und Kontrollkindern aus ländlichen Regionen im Rahmen der PARSIFAL Studie.	58
Tabelle 17:	Haplotype-tagging SNPs sowie die nach bisherigen Erkenntnissen mit atopischen Erkrankungen assoziierten SNPs im TLR2 Gen.	60
Tabelle 18:	Genotypisierung der Single Nucleotide Polymorphismen im TLR2 Gen.	61
Tabelle 19:	Frequenzen der Genotypen der TLR2 Polymorphismen bei Bauernkindern und Kontrollkindern in der PARSIFAL Studie.	61

## 8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Vom Genotyp zum Phänotyp.	8
Abbildung 2:	Zusammenspiel des angeborenen und des erworbenen Immunsystems am Beispiel der Erkennung von LPS durch das CD14-TLR2-Rezeptorsystem.	13
Abbildung 3:	Gel-Elektrophorese des PCR-Produktes im Agarose-Gel.	36
Abbildung 4:	Genotypisierung mittels Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus-Analyse (RFLP) und Gel-Elektrophorese.	37
Abbildung 5:	Schematische Struktur des CD14-Gens mit den Polymorphismen der Promoterregion (Frequenz > 10%).	51
Abbildung 6:	Mediane der Serumspiegel von sCD14 in ng/ml.	53
Abbildung 7:	Mediane der Serumspiegel von sCD14 in ng/ml, aufgetragen nach CD14 C-159T Genotyp bei Münchner und Dresdner Viertklässlern, Gießener Erwachsenen und dem Gesamtkollektiv.	54
Abbildung 8:	Geometrische Mittelwerte der log-transformierten IgE-Werte bei der Gesamtpopulation.	55
Abbildung 9:	Geometrische Mittelwerte der log-transformierten IgE-Werte bei Kindern mit Atopie.	55
Abbildung 10:	Schematische Struktur des TLR2 Gens auf Chromosom 4q31.1-q35.	60
Abbildung 11:	Frequenz des Phänotyps "Aktuelle Symptome von Asthma" nach Genotyp für den TLR2-540 SNP bei Bauernkindern und Kontrollkindern aus denselben ländlichen Regionen aus der Population der PARSIFAL Studie.	63
Abbildung 12:	Frequenz des Phänotyps "Atopie" nach Genotyp für den TLR2-540 SNP bei Bauernkindern und Kontrollkindern aus denselben ländlichen Regionen aus der Population der PARSIFAL Studie.	63
Abbildung 13:	Frequenz des Phänotyps "Diagnose Asthma" nach Genotyp für den TLR2-540 SNP bei Bauernkindern und Kontrollkindern aus denselben ländlichen Regionen aus der Population der PARSIFAL Studie.	64
Abbildung 14:	Frequenz des Phänotyps "Aktuelle Symptome von Heuschnupfen" nach Genotyp für den TLR2-540 SNP bei Bauernkindern und Kontrollkindern aus denselben ländlichen Regionen aus der Population der PARSIFAL Studie.	64
Abbildung 15:	Der Endotoxin-Switch.	72
Abbildung 16:	Der CD14 C-159T SNP und der Endotoxin-Switch.	72

## 9. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ADRB2	Beta2-Adrenorezeptor
ALEX	Allergy and Endotoxin
APC	Antigenpräsentierende Zellen
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
CD	Cluster of Differentiation
D	Deutschland
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fc	Fragment crystallizable
FcεRI	Hochaffiner IgE-Rezeptor
G	Guanin
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Colony stimulating factor
GSF	Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, heutige Bezeichnung: Helmholtz Zentrum München
GST	Glutathion-S-Transferase
H <sub>2</sub> O	Wasser

## Abkürzungsverzeichnis

---

IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
IL-1 $\beta$	Interleukin 1 beta
IL-1R	Interleukin 1 Rezeptor
ISAAC	International Study of Asthma and Allergies in Childhood
kDa	kilo Dalton
KHCO <sub>3</sub>	Kaliumhydrogencarbonat
kU/l	kilo Units pro Liter
LBP	Lipopolysaccharidbindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid, Endotoxin
M	Molar
MALDIMS	Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Massenspektrometrie
MALDI-TOF	Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight
mAmp	Milliampere
mCD14	Membrangebundener CD14-Rezeptor
mg/ml	Milligramm pro Milliliter
Mg <sup>2+</sup>	Magnesiumion
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
$\mu$ l	Mikroliter
mM	milliMolar
mm	Millimeter
NaCl	Kochsalz
ng/ml	Nanogramm pro Milliliter
ng/ $\mu$ l	Nanogramm pro Mikroliter

## Abkürzungsverzeichnis

---

NH <sub>4</sub> Cl	Ammoniumchlorid
nm	Nanometer
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PARSIFAL	Prevention of Allergy Risk Factors for Sensitization In children related to Farming and Anthroposophic Lifestyle
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pH	pondus Hydrogenii
PRR	Pattern Recognition Receptor, Mustererkennungsrezeptor
RFLP	Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus
sBLP	synthetisches Lipopeptid
sCD14	Löslicher CD14-Rezeptor
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SNP	Single Nucleotide Polymorphismus
T	Thymin
T <sub>H</sub>	T-Helferzellen
T <sub>H</sub> 0	Naive, ungeprägte T-Helferzellen
T <sub>H</sub> 1	T-Helferzell-Subpopulation 1
T <sub>H</sub> 2	T-Helferzell-Subpopulation 2
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
UV	Ultraviolett
V	Volt



### 10. Danksagung

Für die Übernahme der vorliegenden Dissertation an der Medizinischen Fakultät der LMU, die Überlassung des Themas und die verständnisvolle Betreuung bedanke ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Michael Kabesch.

Für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes im Forschungszentrum des Dr. von Haunerschen Kinderspitals danke ich Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. D. Reinhardt.

Ich danke allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für Allergogenetik am Dr. von Haunerschen Kinderspital für die freundliche Unterstützung und Kollegialität. An dieser Stelle gebührt besonderer Dank Frau Dr. Michaela Schedel, Herrn Dr. Wilfried Peters, Frau Dr. Waltraud Eder, Frau Ilona Dahmen und Frau Anja Pleiss sowie allen Mitdoktoranden und Mitdoktorandinnen.

Für die Hilfe bei den statistischen Auswertungen danke ich Herrn David Carr und Herrn Martin Depner.

Zudem danke ich besonders Herrn Prof. Dr. Bein, Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der Universität Gießen, für die freundliche Überlassung der sCD14-Messungen und die Daten der Erwachsenenpopulation aus Gießen.

Insbesondere möchte ich der Arbeitsgruppe des Immunologischen Labors am Kinderspital Zürich für die wissenschaftlichen Erfahrungen danken, die ich im Vorfeld dieser Arbeit während eines Forschungsaufenthaltes in Zürich sammeln durfte. Zu nennen sind hierbei besonders Herr PD Dr. Roger Lauener, Frau Susanne Loeliger, Herr Dr. Thomas Birchler und Herr Dr. Remo Frei.

Ein großer Dank gilt meinen Eltern, die mich mein Leben lang liebevoll begleitet und großzügig unterstützt haben und mir das Studium der Medizin sowie die Arbeit an dieser Dissertation erst ermöglicht haben. Ich bedanke ich mich ebenso herzlich bei meinen Geschwistern Stephanie, Sebastian und Matthias für ihre Unterstützung.

Für seine Liebe und stetige Hilfsbereitschaft in allen Lebenslagen kann ich Herrn Dr. Andreas Nagy nicht genug danken. Ohne seine Ermutigung und seinen zuverlässigen Beistand mit Rat und Tat wäre es nie zur Vollendung dieser Arbeit gekommen.

### 11. Lebenslauf

Name: Veronika Elisabeth Schickinger

Geburtsdatum: 06.06.1978

Geburtsort: Altötting

Nationalität: deutsch

Schulbildung:	1984 - 1988	Grundschule Neuötting
	1988 - 1997	König-Karlmann-Gymnasium Altötting
	1994 - 1995	Ludington High School, Ludington, Michigan, USA
Hochschulstudium:	1997 - 2004	Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Beruflicher Werdegang:	2004 - 2005	Assistenzärztin am Zentralklinikum Augsburg, 2. Medizinische Klinik
	2006 - 2007	Assistenzärztin am Ostalbklinikum Aalen, 1. Medizinische Klinik
	2007 - 2008	Assistenzärztin an der St. Anna Virngrundklinik Ellwangen, Chirurgische Klinik
	06-09 / 2008	Assistenzärztin an der Klinik St. Katharinental in Diessenhofen, Schweiz
	seit 10 / 2008	Assistenzärztin am Kantonsspital Winterthur, Schweiz, Medizinische Klinik